MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo XXIII Junho—1930 Fasciculo 5

Do phenomeno de endomixis em ciliados do genero Balantidium (*)

Observações sobre o enkystamento desses ciliados e descripção de uma nova especie parasita do Macacus rhesus

pelos

DRS. ARISTIDES MARQUES DA CUNHA e JULIO MUNIZ

(Com as estampas XLIX-LXV).

Summario Pags.

Introducção. 190
Material estudado. 190
Methodo de pesquisa. 190
Das especies de *Balantidium* encontradas em macacos. 192
Do *Balantidium* parasito do *Macacus rhesus*. 193
Estudo dos kystos do *Balantidium* parasito do *Macacus rhesus*. 193
Estudo dos kystos do *Balantidium coli* do porco. 194
Da posição systematica do *Balantidium* do *Macacus rhesus*. 195
Balantidium simile n. sp. 195
O phenomeno de *endomixis* no *Balantidium simile* 197
Phenomenos que precedem o processo de *endomixis*. 197
Formas em que se inicia o phenomeno de *endomixis*. 198
Alterações por que passa o micronucleo desde o inicio do phenomeno até a formação das duas placentas. 201
Alterações do macronucleo durante o phenomeno. 201
Desenvolvimento das placentas e formação do micronucleo. 202
Reconstituição do apparelho nuclear. 203
Variantes do processo de *endomixis*. 204
Caso em que se formam 4 placentas. 204
Casos de 3 e de 8 placentas. 205
Considerações geraes 205
Significação do phenomeno de *endomixis* 206

(*) Recebido para publicação a 7 de Março de 1930.

INTRODUCÇÃO

No presente trabalho iremos relatar o resultado das nossas pesquisas sobre o phenomeno de *endomixis*, que tivemos occasião de observar em ciliados do genero *Balantidium*, parasitos do *Macacus rhesus*, phenomeno este até agora conhecido sómente entre os ciliados de vida livre.

Estudando esta especie de *Balantidium*, haviamos observado, aliás ha tempos, o apparecimento frequente de certas formas, semelhantes ás encontradas por alguns auctores em parasitos do mesmo genero, mas que não haviam recebido d'elles uma interpretação satisfactoria. Foi com o fim de esclarecer esse ponto, que iniciamos nossas pesquisas e por ellas, pudemos verificar representarem essas formas ao lado de outras, que não tinham ainda sido observadas, phases de um mesmo phenomeno porque passa o ciliado durante a sua vida.

O resultado de nossos estudos, foi exposto resumidamente na sessão da Sociedade Brazileira de Biologia, realisada no dia 29 de Janeiro do corrente anno e reservámos para o presente trabalho, a descripção minuciosa das varias phases do phenomeno bem como a documentação do mesmo, representada por eschemas, desenhos e microphotographias. Além da parte propriamente descriptiva, discutiremos a significação do phenomeno de *endomixis* no cyclo evolutivo dos ciliados, pois, alguns dos factos que tivemos occasião de observar, concorrem a nosso vêr, para esclarecer o modo pelo qual se deva encarar esse phenomeno.

Antes de entrarmos na descripção do phenomeno de *endomixis*, aproveitando a occasião, estudaremos o processo de enkystamento nessa especie de *Balantidium*, tratando em seguida da posição systematica desse ciliado em relação ás outras especies conhecidas (do homem, do porco, da preá e do *Cebus carayá*).

MATERIAL ESTUDADO

O material que utilisámos para o estudo do phenomeno de *endomixis*, provinha de *Macacus rhesus*, importados de Hamburgo, pelo Instituto Oswaldo Cruz para estudos sobre febre amarella. Esses animaes em alta porcentagem apresentavam-se parasitados por ciliados do genero *Balantidium* sendo que alguns delles intensamente.

Trabalhámos sempre com fézes recentemente emittidas. Os macacos geralmente quando aprisionados, ao serem retirados das gaiolas, se debatem e, nessa occasião, quasi sempre defecam, o que facilita enormemente a obtenção do material. Quando isso não acontecia, o material era retirado por meio de sonda. Nunca sacrificámos o animal para colheita das fézes, pois, quasi sempre para melhor estudar o phenomeno, um mesmo animal era observado durante dias seguidos e nesse espaco de tempo as suas fézes eram colhidas n'um mesmo dia, varias vezes, com intervallos de horas. Para estudo comparativo, foi-nos de grande utilidade material com *Balantidium*, de proveniencia humana, do porco, do *Cebus carayá* e da preá, que possuimos archivado na Secção de Protozoologia do Instituto.

METHODO DE PESQUISA

Exame a fresco.—Este methodo se mostrou de pouca utilidade nos nossos estudos, pois, por elle só podiamos suspeitar da existencia no material examinado do phenomeno de *endomixis*, pelo apparecimento de fórmas pequenas do parasito, de aspecto transparente e quasi completamente desprovidas de inclusões e que geralmente representam as formas nas quaes se inicia o phenomeno. Para o estudo das alterações porque passam o macronucleo e o micronucleo durante as varias phases do processo, elle se mostrou de completa inutilidade, pois, a simples observação do macro-

nucleo no estado a fresco é muitas vezes difficil, devido á existencia no interior do corpo do ciliado de grande numero de vacuolos ou de inclusões. O emprego de uma luz artificial intensa, bem como do lugol que tão bons resultados dá na evidenciação do nucleo de outros protozoarios de nada adiantou, pois, este ultimo impregna tão intensamente as inclusões do corpo do ciliado que mascara completamente a observação do nucleo.

Preparações fixadas e coradas.—Devido a grande riqueza em *Balantidium* no material com que trabalhámos, faziamos quasi sempre com elle, esfregaços em laminulas que em seguida eram fixadas a humido. Utilizámos algumas vezes, porém, do processo de fixação em massa. De todos os fixadores por nós utilizados o que deu melhores resultados foi o Bouin alcoolico ou liquido de Duboscq-Brasil, cuja formula é a seguinte:

Alcool a 80º.	150 cc.
Formol a 40 %	60 cc.
Acido acetico crystallizavel	15 cc.
Acido picrico.	1 gr.

Elle nos deu muito melhores resultados que o sublimado—alcool de Schaudinn, não só para fixação das fórmas vegetativas como principalmente dos kystos. O material distendido em camada fina sobre uma laminula era, ainda humido, collocado no liquido fixador pelo espaço de 1 a 2 horas. As laminulas eram transferidas depois para uma placa com alcool a 90º, onde permaneciam até completa eliminação do acido picrico, sendo que o alcool era substituido 2 a 3 vezes durante esse tempo. Em seguida eram passadas para alcool a 70º e dahi para agua afim de soffrerem depois a coloração.

Processos de coloração.—Utilizámos em nossas pesquisas dos seguintes methodos: coloração nucleal de Feulgen, hematoxylina de Delafield, borax-carmin, trioxyferrihemateina de Hansen e o classico processo de Heidenhain, bem como este ultimo modificado.

A reacção nucleal de Feulgen, prestou-se muito para coloração dos kystos, corando no interior delles o nucleo sem que isso se dê com o plasma, o que facilita a observação do primeiro. Para evidenciação do micronucleo e estudo das transformações por que elle passa durante o phenomeno de *endomixis*, a reacção nucleal de Feulgen se mostrou de valor nullo, pois, o micronucleo quasi não se cora por este processo.

O methodo classico de Heidenhain, foi, de todos os processos, aquelle que peiores resultados deu em nossas mãos, pois, o emprego do alumen como differenciador, não permitte que se obtenha uma bôa differenciação do plasma, ficando este ultimo com quasi a mesma tonalidade de coloração que o nucleo. Si se prolongar a differenciação por mais tempo, afim de obter maiores contrastes, entre esses elementos, o nucleo e o plasma se descoram igualmente.

Com uma pequena modificação nesse ultimo processo, conseguimos obter colorações magnificas, que nos facilitaram enormemente o estudo das varias phases porque passa o ciliado durante o processo de *endomixis*. Ella consiste, em substituir o alumen como differenciador, por uma diluição de acido chlorhydrico em alcool a 70º, na proporção de 1 %. As laminulas após fixação pelo Bouin e passagem pelos alcooes a 90º, 70º e agua, eram collocadas na solução a 3,5 % de alumen ferrico. Após 12 horas no mordente, eram lavadas e collocadas na solução de hematoxylina de Heidenhain. No corante permaneciam 5 a 6 horas, a temperatura do laboratorio, podendo, porém, permanecer ahi pelo espaço de 12 horas sem maiores inconvenientes.

As laminulas eram em seguida lavadas e submettidas ao differenciador. Como já dissemos acima, este ultimo é representado por uma diluição a 1 % de

acido chlorhydrico em alcool a 70º. Logo após collocados nessa solução, os preparados adquirem côr avermelhada e vão se descorando. A differenciação precisa ser seguida ao microscopio, devendo ser levada a um ponto em que o plasma do ciliado se mostre quasi que completamente descorado, o que é de grande importancia, pois, pela lavagem em agua após a differenciação, dá-se uma viragem pela qual a côr avermelhada do preparado se transforma em azul escuro o que traz um reforçamento da coloração. Após a permanencia n'agua corrente pelo espaço de 2 horas, os preparados são deshydratados e montados em balsamo Com o emprego dessa technica obtivemos preparados magnificos, nos quaes todos os elementos do ciliado apparecem admiravelmente corados, mesmo o micronucleo que tão mal se cora pelos outros processos.

A hematoxylina de Delafield e o borax carmin que tão bons resultados dão no estudo de outros ciliados, se mostraram de valor inconstante e na dependencia da constituição das fezes. E' assim que, quando estas ultimas são constituidas em grande parte por muco, os *Balantidium* nellas existentes, se coram bem por esses processos, mas fóra disso, se obtem colorações mediocres que não pódem ser comparadas com as obtidas com o processo anteriormente descripto.

A conselho do Dr. Gomes de Faria empregámos o corante trioxyferrihemateina de Hansen (Trioxyeisenhämateinfärbung nach Hansen) com bons resultados. Elle tem a vantagem de ser um processo rapido, corando o apparelho nuclear do ciliado intensamente e em preto.

Os preparados fixados a humido são collocados na solução corante pelo espaço de 10 a 20 minutos. Em seguida lavados e differenciados pelo alcool chlorhydrico. A differenciação deve ser rapida e seguida ao microscopio.

Esse processo se presta muito para a coloração dos kystos, pois corando intensamente o nucleo, permitte que pela differenciação se obtenha um nitido contraste entre esse elemento e as outras partes constituintes do kysto.

Resumindo diremos, que para o estudo do *Balantidium* no estado de vida vegetativa, nenhum dos processos de coloração acima citados substitue o de Heidenhain desde que, em vez do alumen ferrico como differenciador, se empregue uma solução de 1 % de acido chlorydrico em alcool a 70º. Esse processo se presta muito principalmente para o estudo das alterações porque passa o micronucleo durante o phenomeno de *endomixis*.

DAS ESPECIES DE *BALANTIDIUM* ENCONTRADAS EM MACACOS

A presença de ciliados, do genero *Balantidium*, parasitando macacos de differentes especies, tem sido assignalada por varios auctores, taes como Brooks, Noc, Brumpt, Joyeux etc. Quasi todos identificaram os parasitos encontrados ao *Balantidium, coli*. Hegner e Holmes observaram em um macaco proveniente do Brazil *(Cebus variegatus)* um *Balantidium* e assignalaram em seu trabalho differenças morphologicas existentes entre esse *Balantidium* e o *coli*, sem comtudo o considerar como uma especie distincta. Em 1927 descrevemos com o nome de *Balantidium aragaoi* uma nova especie do genero, parasito do *Cebus carayá*.

Demonstrámos então, que esse parasito se differenciava do *Balantidium coli* principalmente pela fórma do macronucleo que era redondo. Hegner, em publicação posterior, sem apresentar razões para isso, considerou essa especie como duvidosa, enquadrando-a com o *Balantidium coli*.

Em um outro trabalho, demonstrámos o absurdo do ponto de vista em que se collocou Hegner, pois, sendo a fórma do macronucleo da especie por nós descripta, differente d'aquella apre-

sentada pelo *Balantidium* do porco e sendo esse caracter constante, não havia razão para estabelecer a identidade das duas especies.

E' preciso levar em conta que a fórma redonda do macronucleo do *Balantidium aragaoi* não póde ser considerada como devida a uma phase especial da evolução do ciliado, pois, nunca encontrámos em todo o material por nós estudado, fórmas com outro aspecto de macronucleo a não ser aquellas, que tambem foram assignaladas em nosso trabalho, possuindo duas placentas arredondadas e que muito acertadamente consideramos como ex-conjugantes.

Baseados nisso, continuámos a encarar o *Balantidium aragaoi* como uma bôa especie e não vemos razão para pensar de outra maneira, pelo menos, emquanto não fôr demonstrado que as fórmas neutras do *Balantidium coli*, possam apresentar, quando mudando do hospedeiro, macronucleo arredondado.

DO *BALANTIDIUM* PARASITO DO *MACACUS RHESUS*

Esse ciliado tem sido até agora considerado como sendo da especie *B. coli*. Este modo de vêr se baseia não só na semelhança morphologica que apresentam as fórmas vegetativas desses ciliados, como no facto demonstrado primeiramente por Brumpt (1909) e confirmado mais tarde por Walker (1913) de que o *Balantidium* do porco póde infectar macacos e vice-versa.

Convém assignalar aqui, que Brumpt trabalhou com o *Balantidium* encontrado parasitando o *Macacus cynomolgus*, sendo que, em uma de suas experiencias, esse ciliado se mostrou pathogenico para o porco determinando uma dysenteria, confirmada pela autopsia que revelou lesões do grosso intestino iguaes ás encontradas na balantidiose humana. Walker em seu trabalho não diz com que especie de macacos trabalhou, affirmando sómente, que conseguiu infectar alguns desses animaes com material humano e do porco contendo *Balantidium*. O exame *post-mortem* de dois desses animaes revelou a presença de fórmas do ciliado no interior das paredes do grosso intestino.

Pelo estudo que fizemos da especie de *Balantidium*, que parasita o *Macacus rhesus*, verificámos que esse ciliado não apresenta em suas fórmas vegetativas nenhuma caracteristica morphologica importante que permitta a sua differenciação do *Balantidium coli*. As dimensões das suas fórmas neutras, conforme se póde ver na tabella C do quadro II que figura neste trabalho, embora um pouco menores que as dimensões dadas por Mac Donald para o *Balantidium coli*, apresentam a relação comprimento—largura igual a 1,26, numero que muito se aproxima de 1,30, encontrado pelo mesmo auctor para a especie do porco.

Vê-se portanto, que baseados sómente na morphologia dos elementos vegetativos não se póde separar o *Balantidium* do *Macacus rhesus* da especie *coli*.

Si isso se dá com as fórmas vegetativas o mesmo não acontece com as fórmas de resistencia ou kysticas, como se verá nas linhas que seguem.

ESTUDO DOS KYSTOS DO *BALANTIDIUM* PARASITO DO *MACACUS RHESUS*

Examinando fézes de *Macacus rhesus* é muito frequente encontrar-se kystos de *Balantidium*, sendo que em alguns casos em grande numero, quer ao lado de fórmas vegetativas do ciliado, quer na ausencia dellas. Os kystos, quando maduros, apresentam-se, pelo exame a fresco, de fórma arredondada, cercados por uma membrana de duplo contorno, refringente, com o seu interior de aspecto granuloso e contendo inclusões. Pelo lugol, póde-se pôr em evidencia no interior do kysto uma grande massa unica ou granulos menores que se coram em pardo e que parecem ser constituidos por glycogenio ou substancia proxima.

Pelo que nos foi dado observar o enkystamento passa-se da seguinte fórma: o ciliado que vae se enkystar não se mostra mais dotado de movimentos de progressão, ficando como que fixo n'um dado ponto, apresentando então intensos movimentos de rotação. Elle se arredonda, dando-se então a formação de uma membrana kystica que, a principio delgada, se mostra depois de um duplo contorno. A estriação, assim como o peristoma, permanecem, podendo ser observados na maioria dos kystos. O movimento de rotação, que no inicio do enkystamento era bastante intenso, vae diminuindo, sendo substituido n'um dado periodo, por simples correntes plasmaticas e essas mesmas desapparecem completamente nos kystos maduros. O ciliado nem sempre enche totalmente o espaço limitado pela membrana kystica, podendo-se notar muitas vezes, um espaço claro comprehendido entre a membrana e o corpo do ciliado.

Nos preparados corados (Feulgen—Delafield) as fórmas iniciaes do enkystamento apresentam-se arredondadas, com uma membrana que póde em alguns exemplares se mostrar desprovida de duplo contorno. No seu interior nota-se um macronucleo guardando ainda aspecto reniforme, deixando vêr um nitido micronucleo collocado no hylo. Já aqui póde-se observar perfeitamente individualizado, como demonstra claramente a coloração pelo methodo de Feulgen, uma massa de substancia de reserva que póde variar de tamanho. N'uma phase mais adiantada, vamos encontrar o macronucleo em fórma de fuso. Por uma especie de estrangulamento desse fuso dá-se a formação de dois novos nucleos que tomam então a fórma arredondada. Tanto nesta ultima phase como na que lhe dá origem, não se consegue evidenciar mais o micronucleo.

A fórma binucleada representa o kysto maduro e é ella que predomina nas fézes do *Macacus rhesus*. Kystos com 4 nucleos, pódem ser raramente observados e elles se originam das fórmas nas quaes se notam 2 nucleos com aspecto de fusos, que após se dividem formando 4 nucleos.

Pensamos que esses kystos representam fórmas supernucleadas a semelhança do que occorre em outros protozoarios.

Os kystos medem cerca de 31,4 micra de diametro como se poderá vêr examinando os dados contidos na tabella A do quadro I e os seus 2 nucleos médem cada um cerca de 8 a 10 micra de diametro.

ESTUDO DOS KYSTOS DO *BALANTIDIUM COLI* DO PORCO

Os dados que possuimos actualmente sobre as fórmas kysticas do *Balantidium coli*, são em pequeno numero, o que poderá ser verificado consultando a bibliographia sobre o assumpto. Os trabalhos existentes, principalmente os de Hartmann e de Dobell e O'Connor, descrevem os kystos do *Balantidium coli*, como possuindo um nucleo unico, alongado, semelhante aos encontrados em algumas fórmas vegetativas. Dobell e O'Connor dão 50 a 60 micra para as dimensões dos kystos ao passo que Hartmann dá 40 micra.

Em material proveniente do porco, contendo kystos de *Balantidium coli* e que serviu para o estudo comparativo que procedemos, elles apresentavam-se arredondados, dotados de membrana espessa, com duplo contorno e mediam cerca de 38,8 micra de diametro conforme se póde vêr no quadro I, tabella B. No interior dos kystos, em preparados corados pela trioxyferrihemateina, encontra-se um plasma de aspecto granuloso que póde apresentar no seu interior um ou mais vacuolos. A massa de substancia de reserva que se encontra nas fórmas kysticas do *Balantidium* do *Macacus rhesus* não são encontradas no presente caso.

O macronucleo é unico e apresen-

ta-se muito alongado, encurvado, com as extremidades dilatadas e atravessa o kysto, muitas vezes, quasi de lado a lado. Elle méde de 20 a 30 micra de comprimento. Nas numerosas fórmas que examinámos não nos foi possivel encontrar o micronucleo.

DA POSIÇÃO SYSTEMATICA DO *BALANTIDIUM* DO *MACACUS RHESUS*

Pelo que acabámos de expôr, póde-se vêr que si as fórmas vegetativas do *Balantidium* parasito do *Macacus rhesus* não se differenciam das do *Balantidium coli*, nem pelas dimensões nem pela morphologia, as fórmas kysticas desses dois ciliados, apresentam differenças nitidas, representadas principalmente pelo numero de nucleos que elles possuem, quando maduros, bem como pelas suas dimensões.

Esses factos aqui relatados, trazem forte argumento contrario a identidade do *Balantidium* encontrado nas infecções espontaneas do *Macacus rhesus* com o *Balantidium coli*.

O facto de se poder infectar o macaco com o *Balantidium* do porco e viceversa não póde ser considerado como argumento definitivo para a identidade dos dois parasitas. Para isso seria preciso demonstrar que o *Balantidium coli* do porco, que ahi forma kystos com nucleo unico, perde essa propriedade quando parasito do macaco, passando as suas fórmas kysticas a possuirem 2 nucleos. O contrario deveria acontecer quando se infecta o porco com *Balantidium* do macaco. Não só esses factos não foram ainda observados em relação ao *Balantidium*, como é difficil conceber que elles realmente se dêm, pois, identico facto não foi até agora assignalado em nenhum outro protozoario.

Baseados na differença nitida que apresentam as fórmas enkystadas, propomos crear para o *Balantidium* encontrado em infecções espontaneas do *Macacus rhesus* e que formam kystos com 2 nucleos, uma nova especie que denominaremos:

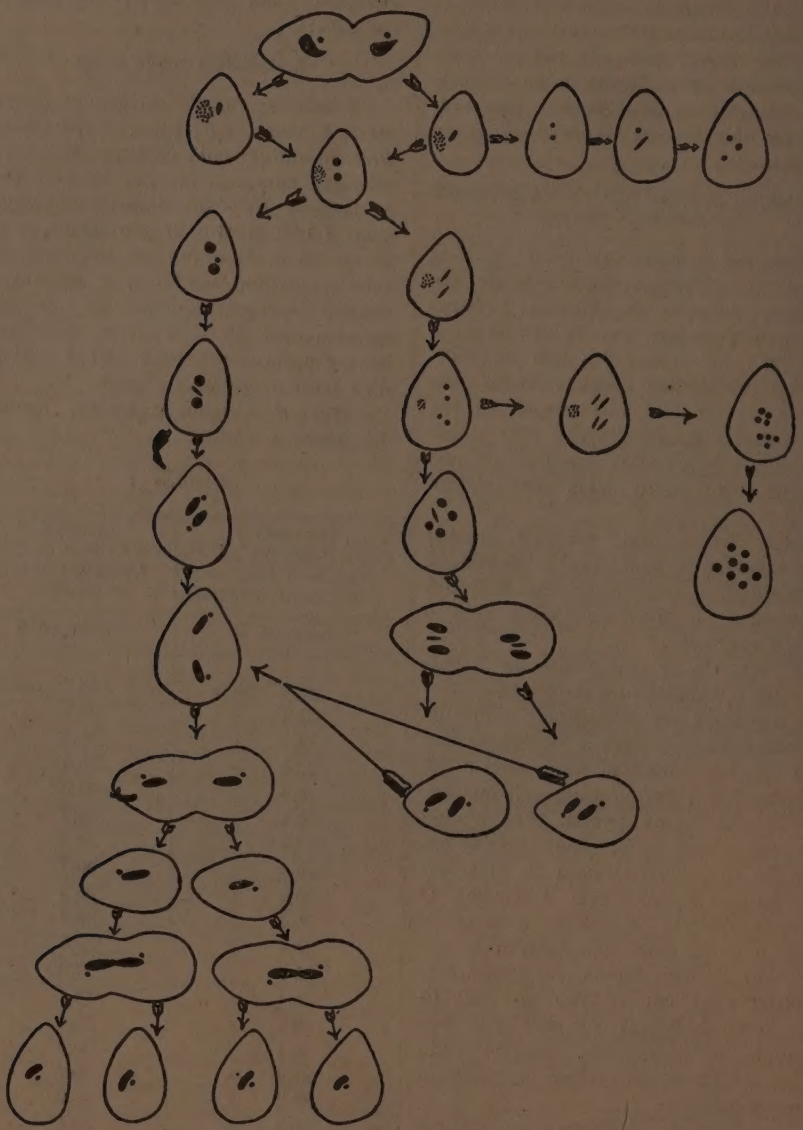
Balantidium simile n. sp.

Diagnose: Ciliado do genero *Balantidium*. Fórmas vegetativas semelhantes as do *Balantidium coli*, medindo de 61 a 86 micra de comprimento por 51 a 70 micra de largura. Relação comprimento/largura igual a 1,26. Kystos arredondados, medindo de 23 a 38 micra de diametro, possuindo, quando maduros, 2 nucleos redondos (excepcionalmente 4) e uma ou mais massas de substancias de reserva. Esta especie geralmente não é pathogenica para o *Macacus rhesus*.

Habitat: caecum e grosso intestino de *Macacus rhesus*.

Quadro I

DIMENSÕES DOS KYSTOS DO *BALANTIDIUM SIMILE*, DO *MACACUS RHESUS*		DIMENSÕES DOS KYSTOS DO *BALANTIDIUM COLI* DO PORCO	
TABELLA A		TABELLA B	
36,4	micra	43	micra
32,2	«	38,7	«
38,7	«	36,4	«
23,6	«	36,4	«
26,4	«	43,0	«
36,4	«	43,0	«
27,9	«	38,7	«
26,4	«	38,7	«
36,4	«	36,4	«
26,4	«	38,7	«
36,4	«	38,7	«
36,4	«	47,3	«
26,4	«	38,7	«
32,2	«	36,4	«
36,4	«	36,4	«
27,9	«	36,4	«
32,2	«	43,0	«
36,4	«	30,1	«
26,4	«	38,7	«
27,9	«	38,7	«
Média 31,4	micra	Média 38,8	micra



Schema do phenomeno de *endomixis* no *Balantidium simile*.

O PHENOMENO DE *ENDOMIXIS* NO *BALANTIDIUM SIMILE*

O phenomeno de *endomixis* foi pela primeira vez observado por Hertwig e mais tarde detalhadamente descripto por Woodruff e Erdmann no *Paramecium aurelia*. Um processo semelhante tem sido assignalado em outros ciliados passando-se o phenomeno ou nas fórmas vegetativas ou após o enkystamento do protozoario. Até agora todos os ciliados nos quaes o processo tem sido observado, são protozoarios de vida livre.

As nossas observações sobre a existencia de identico processo no *Balantidium* parasito do *Macacus rhesus* constituem a primeira observação do phenomeno em ciliados parasitos.

Segundo pudemos verificar, esse phenomeno é bastante frequente no caso do *Balantidium* do *Macacus rhesus*. Elle se passa como a conjugação sob a fórma de verdadeiras epidemias tomando parte nelle a maioria dos individuos.

Apesar da correlação que existe entre as varias phases do processo, expressa pela predominancia n'um mesmo material de uma determinada phase, acontece encontrarem-se sempre, embora em menor numero, ao lado daquella que predomina, phases mais adiantadas ou mais atrazadas.

O phenomeno póde se repetir n'um mesmo animal em espaço de tempo relativamente curto; é assim que n'um dos macacos que forneceu material para nossos estudos (*Rhesus* nº 58) esse phenomeno poude ser observado nos dias 10, 15 e 18 de Janeiro do corrente anno.

A duração das diversas phases do phenomeno é muito variavel, sendo as do inicio e as finaes do processo as mais rapidas emquanto que a phase de placenta é a mais demorada.

PHENOMENOS QUE PRECEDEM O PROCESSO DE *ENDOMIXIS*

A existencia de phenomenos especiaes precedendo o processo de *endomixis*, á semelhança do que occorre na conjugação, embora prevista por Dogiel, não havia sido até agora assignalada.

Em nosso caso verificámos que o processo de *endomixis* é precedido de divisões binarias, que se differenciam d'aquellas dos individuos neutros por certas caracteristicas. No correr do nosso trabalho as denominaremos de divisões progamicas deixando para justificar mais tarde a razão dessa designação.

Quanto ao seu numero não podemos precisar, mas podemos garantir não serem ellas menos de duas, pois, foi esse o numero de divisões que tivemos occasião de observar. Entre si essas duas divisões se differenciavam pelo facto de que as resultantes de uma dellas apresentavam os seus nucleos (macro e micronucleo) em via de alterações especiaes, que estudaremos mais tarde e que indicam o inicio do phenomeno de *endomixis*, enquanto que os da outra nada apresentavam para o lado do apparelho nuclear a não ser uma simples reconstituição que apparece no final de todo o processo de divisão. A primeira dellas representa sem duvida, a ultima das divisões progamicas emquanto que a outra deve representar uma divisão anterior.

Essas duas divisões progamicas se differenciam das divisões das fórmas neutras, por darem origem a individuos de dimensões muito menores como se póde observar comparando a figura 4 da estampa XLIX e 10 e 11 da estampa LI.

A figura 4 da estampa XLIX representa uma fórma de divisão encontrada entre uma população constituida exclusivamente por individuos neutros ao passo que as fórmas representadas nas figuras 10 e 11 da estampa LI provém de material no qual se encontrou grande numero de fórmas iniciaes do phenomeno.

As dimensões de cada individuo tomadas na phase final da ultima divisão progamica são semelhantes ás dos individuos nos quaes se observa o inicio do phenomeno de *endomixis*. Assim, na fórma representada na figura 11 estampa LI o individuo anterior media 43 micra de comprimento por 28 micra de largura, e a posterior 45 por 30 micra, numeros comprehendidos entre as dimensões extremas dos individuos nos quaes se inicia o processo de *endomixis*, que são de 36 a 46 micra de comprimento por 25 a 36 de largura.

Antes mesmo da completa separação dos dois ciliados resultantes da ultima divisão progamica, já o micronucleo se apresenta muito augmentado de volume e as vezes mesmo em inicio de divisão, acompanhada então nesse caso de começo de degeneração do macronucleo.

Jameson, em seu trabalho sobre conjugação do *Balantidium coli*, refere que o phenomeno é precedido do apparecimento de individuos pequenos que se multiplicam rapidamente ao mesmo tempo que decrescem de tamanho, facto este que se assemelha ao que observámos no presente caso. Além disso, as dimensões dadas por Jameson para os preconjugantes são por assim dizer iguaes ás que encontramos nos individuos em que se inicia a *endomixis*. Foram esses factos que nos levaram a identificar as divisões que precedem o phenomeno de *endomixis* ás divisões progamicas.

FRÓMAS EM QUE SE INICIA O PHENOMENO DE *ENDOMIXIS*

Os individuos nos quaes vae se proceder o phenomeno de *endomixis* e que se originam dos individuos neutros por uma serie de divisões progamicas, conforme expuzemos acima, apresentam certos caracteres que os distinguem desses individuos. As suas dimensões são muito menores conforme se póde vêr claramente comparando os dados das tabellas A e C do quadro II que damos em seguida. Na tabella C estão as dimensões de varios individuos neutros e na tabella A as dimensões de igual numero de individuos nos quaes se inicia o phenomeno de *endomixis*. As médias dessas dimensões são as seguintes: 73,7 micra para os primeiros e 41,4 para o segundo, o que quer dizer que o comprimento dos primeiros representa 1,7 vezes o dos segundos. Pelos dados contidos nessas tabellas verifica-se que as fórmas nas quaes se inicia o phenomeno de *endomixis* apresentam-se mais alongadas que as neutras, conforme mostra a relação comprimento—largura que nas primeiras é de 1,46 emquanto que nas segundas é de 1,26.

As fórmas em que se inicia a *endomixis*, são em geral desprovidas de inclusões alimentares e se apresentam ao exame a fresco com aspecto hyalino e muito moveis.

Quanto aos vacuolos contracteis, pelo que pudemos observar, parece que essas fórmas possuem um unico em lugar dos dois que se encontram nos individuos neutros.

O micronucleo apresenta-se muito augmentado de volume e geralmente collocado proximo do macronuleo.

O macronucleo apresenta-se geralmente com uma das extremidades afilada, facto esse, devido a elle não se reconstituir após a divisão progamica e entrar logo em degeneração, como se póde vêr nas figuras 12 e 13 da estampa LI.

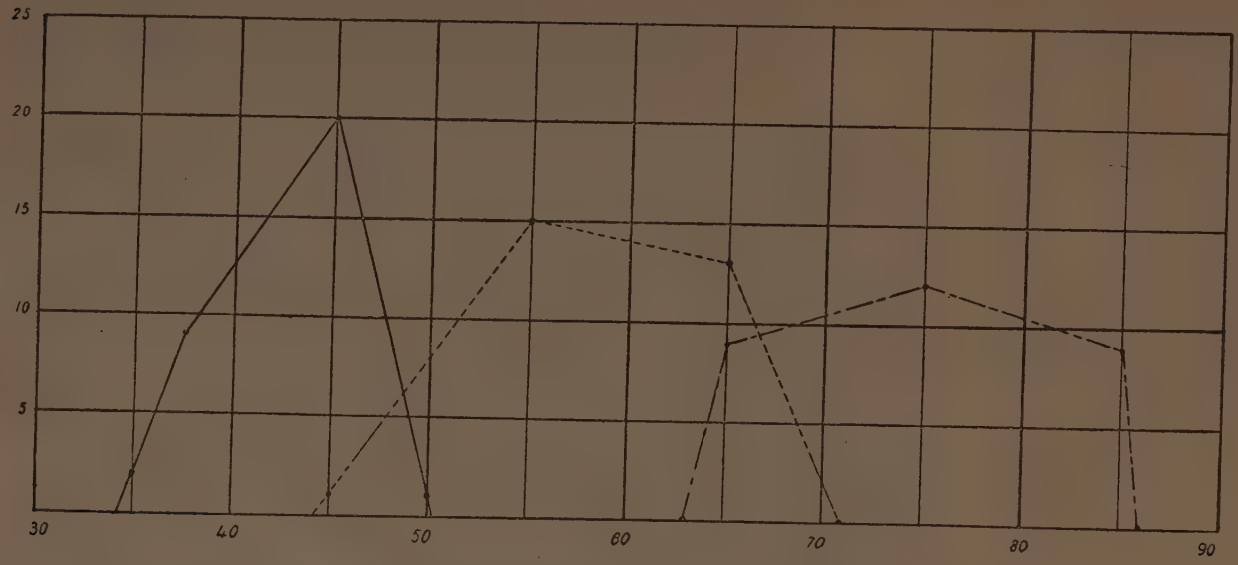
Os caracteres que acabamos de assignalar são semelhantes aos que se observam nos preconjugantes de outros ciliados, principalmente o augmento de volume do micronucleo.

Além disso, si compararmos as dimensões dos preconjugantes do *Balantidium coli* dados por Jameson (45 × 21 micra, em média), veremos que ellas são sensivelmente iguaes ás das fórmas que acabamos de estudar.

Quadro II

C = *comprimento*; L = *largura*; R = *relação comprimento e largura.*

TABELLA A FÓRMAS PROGAMICAS			TABELLA B FÓRMAS COM PLACENTA			TABELLA C FÓRMAS NEUTRAS		
C	L	R	C	L	R	C	L	R
36 micra	30 micra	1,20	55 micra	35 micra	1,57	83 micra	58 micra	1,43
40 «	30 «	1,33	51 «	33 «	1,54	66 «	53 «	1,24
35 «	28 «	1,25	50 «	43 «	1,16	80 «	63 «	1,27
50 «	30 «	1,66	65 «	38 «	1,71	60 «	53 «	1,13
48 «	30 «	1,60	56 «	43 «	1,30	83 «	70 «	1,18
38 «	31 «	1,22	45 «	31 «	1,45	61 «	51 «	1,19
35 «	26 «	1,34	60 «	35 «	1,71	86 «	63 «	1,36
45 «	31 «	1,45	58 «	36 «	1,61	66 «	56 «	1,17
41 «	32 «	1,28	63 «	38 «	1,65	68 «	53 «	1,28
45 «	26 «	1,73	51 «	30 «	1,70	66 «	58 «	1,13
45 «	28 «	1,60	56 «	35 «	1,60	80 «	63 «	1,27
38 «	23 «	1,65	56 «	31 «	1,80	83 «	65 «	1,27
40 «	26 «	1,53	51 «	30 «	1,70	86 «	70 «	1,22
46 «	25 «	1,84	63 «	36 «	1,75	81 «	56 «	1,44
40 «	35 «	1,14	60 «	31 «	1,93	70 «	58 «	1,20
43 «	30 «	1,43	51 «	35 «	1,45	73 «	55 «	1,32
45 «	36 «	1,25	50 «	43 «	1,16	76 «	61 «	1,24
40 «	30 «	1,33	50 «	33 «	1,51	76 «	58 «	1,31
46 «	30 «	1,53	51 «	35 «	1,45	70 «	58 «	1,20
36 «	30 «	1,20	63 «	35 «	1,80	73 «	61 «	1,19
46 «	33 «	1,39	71 «	38 «	1,86	83 «	60 «	1,38
41 «	25 «	1,64	51 «	36 «	1,41	63 «	45 «	1,40
41 «	28 «	1,46	53 «	40 «	1,32	68 «	53 «	1,28
38 «	33 «	1,15	60 «	36 «	1,66	76 «	53 «	1,43
36 «	25 «	1,44	66 «	38 «	1,73	73 «	60 «	1,21
40 «	28 «	1,43	66 «	36 «	1,83	71 «	58 «	1,22
36 «	23 «	1,56	65 «	36 «	1,80	71 «	56 «	1,26
46 «	28 «	1,64	66 «	36 «	1,83	76 «	61 «	1,24
40 «	26 «	1,53	63 «	38 «	1,65	75 «	56 «	1,33
46 «	23 «	2,00	68 «	40 «	1,70	68 «	61 «	1,11
			Médias					
41,4 micra	28,6 micra	1,46	57,8 micra	36 micra	1,61	73,7 micra	58 micra	1,26



GRAPHICO DAS DIMENSÕES DO *BALANTIDIUM SIMILE* DURANTE AS DIVERSAS PHASES DO PHENOMENO DE *ENDOMIXIS*, BEM COMO DAS FÓRMAS NEUTRAS.

As abcissas representam o comprimento do ciliado em micra e as ordenadas o numero de ciliados de cada dimensão.

——————— Individuos na phase inicial do phenomeno.
– – – – – – Individuos com 2 placentas.
—— – —— – —— Individuos neutros.

Baseados nesses factos, consideramos os individuos nos quaes se inicia o phenomeno de *endomixis* como *preconjugantes* e assim os denominaremos no correr do nosso trabalho.

ALTERAÇÕES POR QUE PASSA O MICRONUCLEO DESDE O INICIO DO PHENOMENO ATE' A FORMAÇÃO DAS DUAS PLACENTAS

A primeira modificação que soffre o micronucleo é o augmento de volume, que se inicia, conforme vimos anteriormente, antes mesmo da separação dos preconjugantes após a ultima divisão progamica.

O micronucleo apresenta-se então espherico, deixando ver pequeno numero de finissimos granulos de chromatina no interior de uma massa achromatica. Elle se acha situado geralmente proximo ao macronucleo podendo entretanto algumas vezes se achar afastado delle.

Em seguida entra em divisão que se faz por mitose com a formação de um fuso achromatico, e o apparecimento de uma placa equatorial constituidos por chromosomas cujo numero foi de todo impossivel determinar. Esta é a phase mais commumente encontrada no periodo inicial do phenomeno e se acha representada na figura 15 estampa LI.

Dá-se depois a divisão da placa equatorial seguida de migração para os polos das placas resultantes dessa divisão. Esse phenomeno é acompanhado do estiramento do fuzo e de seu estrangulamento na parte média (fig. 16, estampa LII).

Logo após a separação dos dois nucleos resultantes dessa divisão e antes mesmo da completa reconstituição dos mesmos, já se observa augmento de volume desses nucleos.

Esse augmento de volume corre por conta principalmente da rêde de linina e os nucleos se apresentam então muito pobres em chromatina que se dispõe em granulos esparsos nas traves dessa rêde (fig. 17, estampa LII).

Essa phase do processo parece se processar rapidamente dada a sua pequena frequencia no material por nós estudado.

Com o crescimento, os nucleos resultantes da divisão do micronucleo tomam o aspecto de duas placentas á semelhança do que se observa em outros ciliados.

Mais raramente encontrámos fórmas apresentando duas mitoses do micronucleo. De nossas pesquisas podemos concluir que essas ultimas fórmas correspondem ao caso especial e raro da formação de 4 placentas.

No processo predominante, aquelle em que se formam 2 placentas, ha uma unica mitose do micronucleo.

Si houvesse nesse caso 2 mitoses dahi se originariam 4 nucleos e forçosamente 2 delles tinham de degenerar formando-se as placentas a custa dos dois outros. Mas acontece que nunca observámos micronucleo em via de degeneração nem a persistencia delles ao lado das duas placentas conservando o seu primitivo aspecto. Observam-se tambem fórmas, como a representada na figura 17 da estampa LII, em que se vêm os dois nucleos resultantes da mitose do micronucleo apresentando ainda signaes dessa divisão e já em via de se transformarem em placentas. Além disso, as fórmas com uma mitose são as que predominam em nosso material, o mesmo acontecendo com as fórmas com duas placentas.

ALTERAÇÕES DO MACRONUCLEO DURANTE O PHENOMENO

A degeneração do macronucleo começa as vezes antes mesmo da separação dos dois preconjugantes resultantes da ultima divisão progamica. O macronucleo não chega a se reconstituir após essa divisão, conforme mostra a persistencia de uma extremidade afilada, vestigio de divisão recente, nas fórmas iniciaes do phenomeno onde se observam os primeiros signaes de sua degeneração.

A degeneração se faz pelo afrouxamento da rêde de linina e o apparecimento de granulos intensamente corados.

Esses granulos ás vezes se condensam na peripheria do macronucleo cuja parte central mostra aspecto vacuolado.

A medida que esses granulos augmentam de volume o seu numero diminue, o que se póde explicar pela sua fuzão. Ao mesmo tempo que isso se dá, ha como uma retracção do volume do macronucleo. Em phase mais adiantada o macronucleo é representado por uma massa unica, redonda, compacta e intensamente corada, de dimensões muito menores que as dimensões primitivas do macronucleo. Essa massa diminue progressivamente de tamanho até completo desapparecimento. Excepcionalmente se observa fragmentação do macronucleo em degeneração. O completo desapparecimento do macronucleo se dá durante a phase de crescimento das placentas.

DESENVOLVIMENTO DAS PLACENTAS E FORMAÇÃO DO MICRONUCLEO

Conforme vimos, mal terminada a divisão do micronucleo, os nucleos dahi resultantes crescem rapidamente transformando-se em placentas. Elles se mostram então constituidos por uma rêde de linina em cujas traves se dispõe a chromatina sob a fórma de granulos finos e irregularmente dispostos (figura 17, estampa LII). A evolução da placenta se faz pelo rapido crescimento da rêde de linina e da membrana, que adquirem logo as dimensões de quando completamente desenvolvidas. O augmento da chromatina é menos rapido e se faz pelo crescimento do volume dos granulos que ficam a principio condensados na parte central, cercados de um espaço claro constituido exclusivamente de substancia achromatica, que é separado do protoplasma por uma nitida membrana. Em uma dessas fórmas o tamanho total da placenta é de 10 micra emquanto que a parte central, occupada pela chromatina, apenas media 5 micra. Essa massa central chromatica cresce pouco a pouco até occupar quasi completamente o espaço limitado pela membrana da placenta. Esse crescimento é devido ao augmento da chromatina, pois essa massa central que a principio se corava fracamente, agora, quando completamente crescida, apresenta-se intensamente corada. As placentas perfeitamente desenvolvidas medem de 8 a 12 micra de diametro e apresentam então a seguinte estructura: um corpo central chromatico enchendo quasi completamente o espaço claro que é limitado pela membrana. Esse corpo se mostra de fórma geralmente arredondada mas de contorno muitas vezes irregular, tendo em seu interior a chromatina, que ahi se dispõe irregularmente sobre a fórma de finos granulos, como tambem em massas maiores, que se apresentam então muitas vezes cercadas por ligeiro halo claro. Além dos granulos de chromatina notam-se quasi sempre no interior desse corpo pequenos vacuolos de numero variavel e collocados ou na parte mais interna ou na peripheria concorrendo então para tornar o seu contorno de aspecto irregular.

Durante as varias phases do crescimento da placenta não se observa o micronucleo o que podemos assegurar baseados na observação de centenas de fórmas.

As placentas a principio afastadas, approximam-se depois até se collocarem uma ao lado da outra.

A formação do micronucleo se faz a custa de uma das placentas conforme mostram claramente as figuras 19 e 20 da estampa LII.

Ahi vemos o micronucleo corando-se menos intensamente que a placenta, alojado em uma depressão desta e ainda envolto pela membrana placentaria.

O micronucleo é expulso da placenta já completamente constituido e não nos foi possivel observar como elle se fór-

ma no interior dellas, devido á existencia das massas de chromatina que acima assignalámos.

A expulsão do micronucleo se dá geralmente quando as placentas estão proximas uma da outra, sendo que em alguns casos, porém, isso se dá quando ellas se acham ainda afastadas (figuras 21 e 22, estampa LIII).

Com a approximação das placentas e formação do micronucleo este fica geralmente collocado entre ellas.

As placentas perdem então a fórma espherica e as faces que ficam voltadas uma para outra, apresentam-se achatadas ou mesmo dotadas de uma concavidade limitando um espaço, geralmente de fórma lenticular, em que se aloja o micronucleo. Esse espaço fica como que forrado pelas membranas das duas placentas.

Durante esse periodo o ciliado cresce principalmente no comprimento, medindo 45 a 71 micra de comprimento por 30 a 43 de largura ou em média 57,8 × 36. A relação comprimento—largura que era em média nos preconjugantes de 1,46, passa aqui a 1,61, o que demonstra a nossa asserção.

As fórmas com duas placentas já desenvolvidas com ou sem micronucleo, são as que se observam com mais frequencia o que indica ser essa a phase mais demorada do processo de *endomixis*.

RECONSTITUIÇÃO DO APPARELHO NUCLEAR

As transformações por que passa o apparelho nuclear, da phase que acabamos de estudar até adquirir a estructura typica que apresentam as fórmas neutras, são acompanhadas de duas divisões do ciliado, de modo que, de um individuo em que se passa o phenomeno de *endomixis*, se originam quatro individuos neutros.

O processo se inicia pela divisão do micronucleo. Esta se faz por mitose, que differe das anteriormente descriptas por ser o fuso muito menor.

A divisão do micronucleo se faz geralmente quando as duas placentas se acham proximas uma da outra collocando-se então o fuso entre ellas.

No caso em que o micronucleo se forma muito antes da approximação das placentas, a divisão delle póde se iniciar com ellas ainda afastadas.

Uma vez terminada a divisão, cada um dos micronucleos della resultantes se colloca junto de uma das placentas.

Estas então se alongam tomando a forma de faixa cujo comprimento é de 2,5 a 3 vezes a sua largura.

A principio ellas permanecem ao lado uma da outra, sendo que o estiramento se faz em sentidos parallelos.

Os micronucleos se collocam então, cada um delles junto a extremidade de cada placenta mas, em sentido opposto.

As placentas assim alongadas, emigram dirigindo-se cada uma dellas para uma das extremidades do ciliado. Essa migração se faz no sentido de sua maior dimensão, occupando o micronucleo geralmente a extremidade na direcção da qual se dá a migração.

Em alguns casos póde o micronucleo se collocar ao lado dessa extremidade, mas sempre proximo della.

Concomitantemente apparecem signaes de divisão do plasma que se accentuam a medida que se dá a migração das placentas, até completa separação dos dois ciliados, cada um dos quaes fica com uma placenta alongada em fórma de faixa e um micronucleo situado junto de uma das extremidades da mesma.

A estructura que apresenta a placenta nestas fórmas é muito caracteristica, pois, a sua chromatina se dispõe sob a fórma de filamentos que percorrem a placenta no seu maior comprimento, dando a impressão de estar ella se estirando para entrar em divisão. Por esses carac-

teres essas fórmas pódem ser facilmente distinguidas dos individuos neutros.

Os individuos assim formados entram em nova divisão que se inicia pela do micronucleo indo se collocar cada um dos resultantes da divisão, junto ás extremidades da placenta cujo estiramento é nesse momento mais pronunciado.

Dá-se então o estreitamento da parte média da placenta até completa divisão da mesma, que é acompanhada da do plasma formando-se assim dois ciliados cada um dos quaes com um micronucleo e uma placenta que se reconstitue adquirindo o aspecto do macronucleo dos individuos neutros.

Essa segunda divisão se distingue da divisão das fórmas neutras não só por apparecer em material em que predominam os individuos com 2 placentas e juntamente com as fórmas da divisão precedente, como por outros caracteres que iremos precisar e que permittem reconhecel-a com segurança.

E' assim que na divisão das fórmas vegetativas o macronucleo estirado fica situado na parte média do ciliado coincidindo o plano de sua divisão com o do plasma: na divisão final do processo de *endomixis* nem sempre isso se dá, pois, a placenta estirada permanece geralmente proxima a uma das extremidades do ciliado e o plano de divisão da placenta não coincide com o do plasma, não existindo tambem perfeita correlação entre esses dois processos.

Além disso, nessas fórmas, o macronucleo em divisão se mostra muito menos volumoso em relação ao plasma do que nas fórmas correspondentes da divisão dos individuos neutros.

O que acabamos de affirmar melhor do que em qualquer descripção, resalta da comparação das figs. 4 da estampa XLIX e 32, 33 e 34 da estampa LV e das microphotographias nº 2 da estampa LX, nºs. 21 e 22 da estampa LXIII e nºs. 23, 24 e 25 da estampa LXIV.

VARIANTES DO PROCESSO DE *ENDOMIXIS*

O phenomeno de *endomixis* embora se passe na maioria das vezes da fórma que acabamos de descrever, póde num pequeno numero de individuos apresentar variantes constituidas pela formação de maior numero de placentas que na fórma habitual.

Dessas variantes a mais frequente é aquella em que se formam 4 placentas, podendo-se ainda excepcionalmente encontrar fórmas com 3 e 8 placentas.

Não podemos estabelecer a percentagem de frequencia dessas variantes, pois, mesmo no caso mais commum entre ellas, o de fórmas de 4 placentas, era preciso muitas vezes percorrer um ou mais preparados cheios de individuos com 2 placentas para encontrar algumas fórmas dessa variante.

Quanto aos dois outros casos, para dar uma ideia de sua extrema raridade, basta lembrar que em todo o nosso material, só duas vezes encontrámos fórmas com 8 placentas, uma unica com 3.

Por isso mesmo, no estudo dessas variantes, apenas a primeira, aquella em que se fórmam 4 placentas, poude ser melhor estudada.

CASO EM QUE SE FORMAM 4 PLACENTAS

Como vimos na parte em que estudámos as alterações por que passa o micronucleo desde o inicio do phenomeno até a formação das placentas, encontram-se raramente fórmas apresentando 2 mitoses do micronucleo. Expuzemos então as razões que nos levaram a não incluir essas fórmas no decurso habitual do phenomeno, considerando-as como estadio inicial da variante em que se fórmam 4 placentas.

Dessas duas mitoses resultam 4 micronucleos que crescem transformando-se em placentas. Estas se apresentam geralmente na parte média ou posterior do ciliado e, em uma phase adiantada, agrupam-se duas a duas.

O micronucleo, como no caso de 2 placentas, é unico e se forma a custa de uma das placentas. Esse micronucleo se divide dando dois outros.

Os grupos constituidos cada um delles, por um micronucleo resultante dessa divisão e duas placentas, se afastam em direcção ás extremidades oppostas do ciliado, ao mesmo tempo que se inicia a divisão do plasma. Terminada esta, fica cada ciliado della resultante com duas placentas e um micronucleo, que entra em divisão, como no caso da formação de 2 placentas.

CASOS DE 3 E DE 8 PLACENTAS

Desses dois casos sómente pudemos observar individuos em que as placentas já se acham formadas, sem termos visto nenhuma das phases que precedem a sua constituição nem sua evolução posterior para individuos neutros.

Cremos porém não ser difficil explicar a origem das fórmas que observámos nesses dois casos.

Quando se dá a formação de 3 placentas após a primeira mitose do micronucleo, um dos nucleos dahi resultantes evolue logo para placenta emquanto que o outro soffre uma nova divisão.

No caso de 8 placentas temos 3 divisões successivas do micronucleo das quaes resultam 8 nucleos que evoluem posteriormente para placentas.

CONSIDERAÇÕES GERAES

Si considerarmos o phenomeno descripto no presente trabalho em sua essencia, veremos que elle consiste na substituição do primitivo macronucleo que degenera por um novo formado a custa do micronucleo, tudo isso se passando sem o concurso de outro individuo e sem fusão de chromatina. Assim não póde subsistir duvida de que se trata de um phenomeno de *endomixis*.

Em dois pontos o phenomeno agora observado differe das descripções existentes de identico processo em outros ciliados.

O primeiro se refere a existencia, precedendo o processo, de divisões do ciliado das quaes resultam fórmas especiaes, differentes das fórmas neutras e que identificamos aos preconjugantes.

Esse facto, embora não tenha sido anteriormente assignalado, deve ser considerado, não como peculiar ao presente caso, mas sim como um processo geral e necessario para a realização do phenomeno.

O outro ponto se refere a transformação dos nucleos resultantes da divisão do micronucleo em placentas, e formação posterior de um novo micronucleo a custa de uma dellas.

No caso do *Paramecium* e de outros ciliados, os nucleos resultantes da divisão do micronucleo têm destino diverso, uns se transformando em placentas, e outros permanecendo como micronucleos. No caso do *Balantidium* isso não acontece, pois, como vimos, todos os nucleos formados pela divisão do micronucleo se transformam em placentas, dando origem, assim, a fórmas nas quaes não existe micronucleo. Este se fórma depois a custa de uma das placentas.

Por ser a phase em que se observam duas placentas com ou sem micronucleo, a de mais longa duração do processo e portanto aquella que se encontra com mais frequencia, já tinha sido ella observada por outros auctores em ciliados do genero *Balantidium*. E' assim que Hegner e Holmes encontraram fórmas semelhantes no *Balantidium* parasito do *Cebus variegatus* e as interpretaram como individuos em que se havia dado a divisão do macronucleo sem divisão simultanea do plasma.

A observação em algumas dessas fórmas do micronucleo em divisão é encarada por elles como argumento favoravel a essa interpretação.

As massas de chromatina que muitas vezes se observam no interior das placentas, foram consideradas como chromosomas e comparados aos chromosomas trophicos das *Opalinas*.

Felix Pritze observou fórmas identicas no *Balantidium* parasito do porco e dá para ellas a mesma interpretação.

Em nosso trabalho sobre o *Balantidium aragaoi* assignalámos tambem fórmas com duas placentas interpretando-as como ex-conjugantes.

Os resultados do presente trabalho, bem como os do trabalho de Jameson sobre a conjugação no *Balantidium coli*, mostram o acerto de nossa interpretação e o quanto se afasta da verdade a maneira de vêr dos autores acima citados.

Presentemente tivemos occasião de encontrar em material de *Balantidium coli*, quer de procedencia humana, quer do porco, individuos apresentando duas placentas. O mesmo facto foi observado em outros ciliados como na *Isotricha ruminantium* e *Bütschlia parva* por Dogiel e na *Paraisotricha acuminata* por nós.

Da observação de fórmas com duas placentas não se póde concluir da existencia do phenomeno de *endomixis*, pois ellas tambem occorrem na conjugação. No caso especial do *Balantidium*, fórmas semelhantes foram observadas por Jameson em ex-conjugantes. Jameson diz que os dois pronucleos não se fundem e que ha indicios de que um corpusculo menor que elle considera como sendo o micronucleo, se fórma a custa delles de maneira indeterminada.

Pelos estudos desse autor sobre a conjugação do *Balantidium*, vê-se a semelhança existente entre os dois phenomenos, facto aliás já observado em outros ciliados.

Jameson admitte a fusão das duas placentas para formar o macronucleo. Em nosso caso é fóra de duvida que isso não se dá e é provavel que o mesmo aconteça na conjugação o que só poderá ser decidido por novas pesquisas. A formação de mais de uma placenta e a divisão posterior do plasma para distribuição dellas em tantos individuos quantas são as placentas, já eram conhecidas em outros ciliados, tanto na *conjugação* como na *endomixis* e foram interpretadas por Schweyer como caso de polyembryonia, a semelhança do que occorre em certos metazoarios.

SIGNIFICAÇÃO DO PHENOMENO DE *ENDOMIXIS*

Hertwig, que pela primeira vez observou o processo de *endomixis*, o considerou como um phenomeno de parthenogenese e assim o denominou.

Mais tarde Woodruff e Erdmann, que estudaram detalhadamente o phenomeno no *Paramecium aurelia*, não se mostraram favoraveis a essa opinião, creando então, para designar o phenomeno, o novo termo de *endomixis*.

Os autores que consideram a *endomixis* como um caso de parthenogenese baseiam suas convicções na semelhança que apresenta esse phenomeno com a conjugação em todas as suas phases, a não ser na divisão de reducção, na troca e fusão de nucleos, isto é, nas phases que caracterisam o phenomeno de fecundação

Woodruff e Erdmann acham, para que o phenomeno de *endomixis* seja considerado como um caso de parthenogenese, necessario demonstrar nelle a existencia de uma divisão de reducção e ainda mais que o micronucleo em que se passa o phenomeno corresponda ao nucleo de um gameto.

O facto de não existir uma terceira divisão do micronucleo no phenomeno de *endomixis* do *Paramecium aurelia* não prova que não exista reducção do numero de chromosomas, pois, como sabemos, essa reducção não se faz muitas vezes na terceira divisão e sim numa divisão anterior como é o caso do *Dididium nasutum* estudado por Prandtl e do *Chilodon uncinatus*, de accordo com Enriques.

Mesmo que se demonstrasse a não existencia de reducção na *endomixis*, ainda assim não haveria motivo para não ser ella considerada como parthenogenese, a não ser que se adoptasse a opinião de Strasburger.

Essa opinião não é seguida pela maioria dos autores e assim Winkler divide a parthenogenese em dois grupos, aquelles em que não ha reducção, *parthenogenese somatica* ou *diploide* e aquelles em que ha reducção, *parthenogenese geradora* ou *haploide*.

Nem nos parece razoavel a necessidade de reducção no phenomeno de parthenogenese, pois, ella não se observa em muitos casos na formação dos gametos vindo a se dar sómente após a fecundação, como no caso dos coccidios, para só citar um exemplo entre os protozoarios. Erdmann, em trabalho posterior, já considera o phenomeno de *endomixis* como um caso de parthenogenese diploide.

A demonstração feita por Dogiel da existencia, precedendo o phenomeno de conjugação, de divisões especiaes (divisões progamicas), das quaes resultam individuos com caracteres proprios, differentes daquelles das fórmas neutras e destinados a conjugação *(preconjugantes)*, veio até certo ponto alterar a semelhança entre os dois phenomenos, pois esse facto não havia sido observado na *endomixis*.

Como vimos, um dos factos principaes de nossas pesquisas é exactamente a demonstração da existencia, precedendo o phenomeno de *endomixis*, de divisões das quaes resultam individuos differentes dos individuos neutros e nos quaes se processa o phenomeno. Ainda mais, mostrámos como, em nosso caso, esses individuos são identicos aos preconjugantes do mesmo ciliado, conforme se póde vêr comparando as fórmas por nós estudadas com as descriptas por Jameson na conjugação do *Balantidium*.

Esse facto, como já dissemos, não deve ser considerado como peculiar ao caso do *Balantidium* por nós estudado e sim como um processo geral e necessario para que se dê o phenomeno de *endomixis*. Se elle ainda não havia sido observado, é porque não se conhecia até agora phenomeno de *endomixis* em nenhum ciliado parasito, onde a differença dos preconjugantes e dos individuos neutros é mais accentuada.

Vemos, assim, que o phenomeno de *endomixis* se passa, não em uma cellula somatica, mas em um preconjugante, isto é, em uma fórma do ciliado destinado a fecundação, o que traz forte argumento em favor daquelles que consideram o phenomeno de *endomixis* como um caso de parthenogenese.

Bibliographia

BRUMPT, E. 1909.—Demonstration du rôle pathogène du *Balantidium coli*. C. R. Soc. Biol. Vol. 67.

CALKINS, G. e BOWLING, R. 1929.—Studies on *Dallasia frontata* Stokes II cytology, gametogamy and conjugation. Arch. f. Protistenkunde Bd. 66, H. 1.

CUNHA, A. M. e MUNIZ, J. 1927.—Sobre os ciliados do genero *Balantidium* parasitos dos macacos. Boletim Biologico. Abril—Fasc. 5.

DOBELL, C. e O'CONNOR, F. W. 1921.—The Intestinal Protozoa of Man. London.

DOGIEL, V. 1925.—Die Geschlechtsprozesse bei Infusorien (speziell bei den Ophryoscoleciden). Arch f. Protistenkunde. Bd. 50.

DOGIEL, V. 1928.—Ueber die Conjugation von *Bütschlia parva*. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 62.

ENRIQUES, P. 1907, 1908.—La conjugazione negli Infusori, I. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 9 e 12.

ERDMANN, R. 1922.—Art und Artbildung bei Protisten. Biologisches Zentralblatt. Bd. 42.

HARTMANN, M. 1927.—Allgemeine Biologie—Jena.

HARTMANN, M. e SCHILLING, C. 1917.—Die pathogenen Protozoen—Berlin.

HEGNER, R. W. e HOLMEES, F. O. 1923..—Observations on a *Balantidium* from a Brazilian monkey, *Cebus variegatus*, E. Geoffr., with special reference to chromosome—like bodies in the macronuclei. Amer. Journ. Hyg. 3.

IVANIC, M. 1928.—Ueber die mit den Parthenogenetische Reorganisationsprozessen des Kernapparates verbundenen Vermehrungscysten von *Chilodon uncinatus* Ehrbg.. Archiv. f. Protistenkunde. Bd. 61.

IVANIC, M. 1929.—Ueber die centrosomenähnlichen Gebilde bei der Grosskernteilung und die promitotische Kleinkernteilung, nebst Bemerkungen über die Chromosomenverhältnisse bei einen Infusor. (*Euplotes patella* Ehrbg.). Arch. f. Protistenkunde. Bd. 66. Hf. 1.

JAMESON, A. P. 1927.—The behaviour of *Balantidium coli* Malm. in cultures. Parasitology. Vol. 19, N°. 4 Dec.

MC DONALD, J. D. 1922.—On *Balantidium co'i* (Malmsten) and *Balantidium suis* (sp. nov.), with au account of their neuromotor apparatus University of California Publications in Zoology. Vol. 20, N°. 10 May 8.

PRANDTL, H. 1906.—Die Conjugation von *Didinium nasutum*. Arch. f. Protistenkunde. Bd. 7.

PRITZE, F. 1928.—Beiträge zur Kenntnis der *Balantidium coli*. Zeitschrift für Parasitenkunde. Bd. 1 f. 3.

PROWAZEK, S. V. 1920.—Infusoria—Ciliata. — Prowazek—Handbuch der path. Protozoen. Vol. 2.

WENYON, C. M. 1926.—Protozoology.

WOODRUFF, L. L. e ERDMANN, Rh. 1914.—A normal periodic reorganization process without cellfusion in *Paramecium*. The Journal of Experimental Zoology. Vol. 17.

Explicação das estampas

ESTAMPA XLIX

Balantidium simile

Fig. 1—Fórma neutra.

Figs. 2 e 3—Apparelho nuclear de um individuo neutro, mostrando a collocação do micronucleo em relação ao macronucleo.

Fig. 4—Individuo neutro em divisão. Um dos micronucleos não foi representado por se achar collocado debaixo do macronucleo.

ESTAMPA L

Fig. 5—Fórma recentemente enkystada deixando vêr ainda o micronucleo.

Fig. 6—Fórma kystica com o nucleo em divisão.
Fig. 7—Kysto maduro, mostrando 2 nucleos e uma massa de substancia de reserva (coloração pelo Feulgen).
Fig. 8—Kysto com os dois nucleos em divisão.
Fig. 9—Kysto com 4 nucleos (fórma supernucleada) (coloração pelo Feulgen).

ESTAMPA LI

Endomixis no *Balantidium simile*

Fig. 10—Divisão progamica.
Fig. 11—Phase final da ultima divisão progamica.
Figs. 11a e 11b—Apparelho nuclear das fórmas precedentes visto com maior augmento, mostrando o micronucleo augmentado de volume já em inicio de divisão e o macronucleo em via de degeneração.
Fig. 12—Fórma mostrando o inicio do phenomeno de *endomixis* com o micronucleo augmentado de volume e o macronucleo em inicio de degeneração, apresentando uma das extremidades ainda afilada, vestigio de recente divisão (ultima divisão progamica).
Fig. 13—Apparelho nuclear de uma fórma no inicio do phenomeno. Micronucleo em mitose, macronucleo em degeneração com uma extremidade afilada.
Fig. 14—Micronucleo em mitose, macronucleo em degeneração adiantada, mostrando a disposição peripherica da chromatina.
Fig. 15—Mitose do micronucleo, mostrando a placa equatorial.

ESTAMPA LII

Fig. 16—Phase adiantada da divisão do micronucleo, macronucleo em degeneração.
Fig. 17—Os dois nucleos provenientes da divisão do micronucleo, ainda com vestigios dessa divisão e já em via de crescimento para se transformarem em placentas, macronucleo em degeneração.
Fig. 18—Fórmas com duas placentas e o macronucleo em adiantada degeneração.
Figs. 19 e 20—Formação do micronucleo a custa de uma das placentas.

ESTAMPA LIII

Figs. 21 e 22—Micronucleo já formado e em divisão com as duas placentas ainda afastadas.
Fig. 23—Micronucleo em divisão collocado entre as duas placentas.
Fig. 24—Micronucleo em divisão, visto com maior augmento, deixando vêr as duas placas formadas pela divisão da placa equatorial em via de migração para os polos.
Fig. 25—Phase final da divisão do micronucleo.
Fig. 26—Fórma com dois micronucleos provenientes da divisão representada nas figs. precedentes e com duas placentas em inicio de estiramento.

ESTAMPA LIV

Fig. 27—Placentas estiradas, collocadas ao lado uma da outra e com os micronucleos nos polos oppostos.
Fig. 28—Placentas estiradas em via de migração com os micronucleos junto ás extremidades.
Figs. 29 e 30—Duas phases da migração das placentas, em ambas se observam os primeiros signaes de divisão do plasma.

ESTAMPA LV

Fig. 31—As duas placentas, após migração, acham-se collocadas nas extremidades do ciliado, que apre-

senta adiantada divisão do plasma.

Fig. 32—Fórma proveniente da divisão representada na figura precedente, com o macronucleo estirado junto a uma das extremidades do qual se vê o micronucleo.

Fig. 33—Apparelho nuclear de uma fórma semelhante á representada na figura precedente.

Fig. 34—Fórma mais adiantada que as precedentes deixando vêr a divisão do micronucleo e o estreitamento da parte média do macronucleo.

ESTAMPA LVI

Fig. 35—Fórma semelhante á precedente em estado mais adiantado.

Figs. 36, 37 e 38—Macronucleo em degeneração, duas mitoses do micronucleo (fórmas destinadas a formação de 4 placentas).

Fig. 39—Fórma com 4 placentas e o macronucleo em degeneração.

Fig. 40—Quatro placentas dispostas duas a duas e um micronucleo em divisão.

ESTAMPA LVII

Fig. 41.—Fórma com 4 placentas dispostas em pares, cada um delles com um micronucleo e collocados nas extremidades do ciliado, que mostra inicio de divisão do plasma.

Fig. 42—Fórma semelhante á precedente (coloração pelo Feulgen).

Fig. 43—Fórma proveniente da divisão anterior com as duas placentas alongadas e o micronucleo em divisão.

Fig. 43a—Apparelho nuclear da fórma precedente vista com maior augmento.

Fig. 44.—Fórma com 8 placentas.

ESTAMPA LVIII

Balantidium coli do porco.

Fig. 45—Individuo neutro em divisão.

Fig. 46—Kysto (coloração pelo trioxiferrihematheina).

Fig. 47—Fórma com duas placentas sem micronucleo (coloração pelo borax-carmin).

Fig. 48—Fórma com 2 placentas e micronucleo (coloração pelo borax-carmin).

Balantidium coli do homem.

Fig. 49—Fórma com 2 placentas (coloração pelo borax-carmin).

Todos os desenhos foram feitos com camara clara á altura da mesa. As figs. 4, 10, 11, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49, com augmento de cerca de 1.200 diametros; a figura 24 com augmento de cerca de 3.000 diametros e as demais com augmento de 1.750 diametros.

Todas as figuras que não trazem indicação foram feitas de preparados corados pelo Heidenhain modificado.

ESTAMPA LIX

Fig. 1—Fórma neutra do *Balantidium aragaoi* mostrando o macronucleo arredondado tendo ao lado o micronucleo.

Fig. 2—Fórma do *Balantidium aragaoi* com duas placentas e o micronucleo já formado.

Fig. 3—Fórma semelhante a anterior com o micronucleo em divisão.

Desenhos feitos com a camara clara a altura da mesa. Augmento 1750 diametros.

Microphotographias

ESTAMPA LX

Fig. 1—Fórma vegetativa do *Balantidium simile.*

Fig. 2—Fórma de divisão do *Balantidium simile.*

Fig. 3—Kysto do *Balantidium simile* ainda com o macronucleo unico.

Fig. 4—Kysto do *Balantidium simile* mostrando o nucleo em fórma de fuso, (microphotographia feita com maior augmento que a do nº 3).

Fig. 5—Kysto maduro do *Balantidium simile,* mostrando 2 nucleos provenientes da divisão do macronucleo.

Fig. 6—Kysto do *Balantidium simile* mostrando em *s. res.* a massa de substancia de reserva e em *n* o nucleo (microphotographia tirada com o mesmo augmento que a do nº 4).

Fig. 7—Kysto maduro do *Balantidium coli* do porco. Em *m* vê-se o macronucleo, unico, em fórma de faixa e atravessando todo o kysto.

ESTAMPA LXI

Fig. 8—Fórma de divisão do *Balantidium coli* do porco.

Fig. 9—Fórma progamica do *Balantidium simile,* mostrando em *micro* o micronucleo augmentado de tamanho e em *macro* o macronucleo.

Fig. 10—Fórma progamica do *Balantidium simile* mostrando em *micro,* o micronucleo se dividindo, em fórma de fuso. Vê-se na parte central do fuso os chromosomios. Junto do micronucleo encontra-se o macronucleo.

Fig. 11—*Balantidium simile,* mostrando em *pl* as duas placentas já formadas e em *macro* o macronucleo já degenerado com fórma arredondada e corando-se intensamente em preto (microphotographia tirada com pequeno augmento, para mostrar as duas placentas que se achavam em planos differentes).

Fig. 12—A mesma fórma da microphotographia nº 11, tirada com maior augmento, ficando uma das placentas fóra de fóco. Esta microphotographia foi tirada para mostrar a estructura que apresenta a placenta no inicio do seu crescimento; *m* indica o limite da membrana já completamente desenvolvida, emquanto que a massa *c* que se mostra corada e na qual se encontra a chromatina, por não se achar completamente desenvolvida, ainda não enche o espaço limitado pela membrana. Em *macro* vê-se o macronucleo degenerado, de fórma arredondada, e intensamente corado e com o seu tamanho muito reduzido.

Fig. 13—Fórma com duas placentas *(pl.)* e na qual não se nota mais vestigios do macronucleo; *e* mostra o espaço claro existente entre a membrana da placenta e a massa central chromatica.

ESTAMPA LXII

Fig. 14—Fórma com duas placentas, já proximas uma da outra. Nesta fórma não se nota a membrana que cerca a placenta.

Fig 15—Fórma em que as duas placentas encontram-se proximas uma da outra e entre ellas vê-se nitidamente o micronucleo *(micro).*

Fig. 16—Fórma com as duas placentas já em fórma de faixa collocadas parallelamente uma a outra e prestes a emigrarem para as

extremidades oppostas do parasito.

Fig. 17—Fórma em que mostra as duas placentas estiradas e já emigrando cada uma dellas para uma das extremidades do parasito.

ESTAMPA LXIII

Figs. 18 e 19—2 fórmas com as placentas emigrando e com indicios de divisão do plasma.

Fig. 20—Fórma em que as duas placentas já se encontram nas extremidades oppostas do parasita.

Figs. 21 e 22—Fórmas provenientes da divisão das fórmas anteriores, mostrando as placentas muito estiradas.

ESTAMPA LXIV

Figs. 23 e 24—Fórmas semelhantes as dos numeros 21 e 22, porém numa phase mais adiantada, mostrando signaes de divisão do plasma.

Fig. 25—Fórma representando uma phase mais adiantada de divisão. Em *b* vê-se o novo cytostoma já formado.

Fig. 26—Fórma final da divisão das fórmas precedentes. Macronucleo ainda não reconstituido.

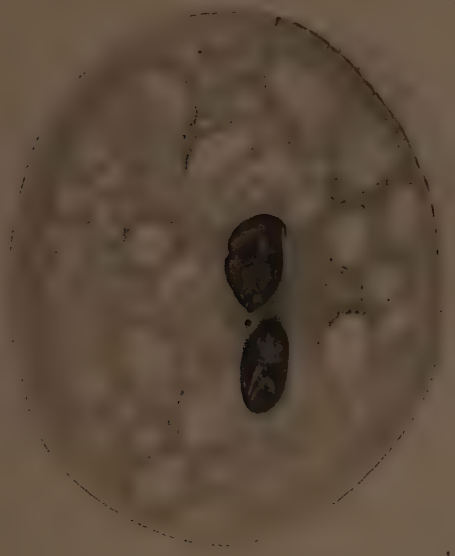
ESTAMPA LXV

Fig. 27—Fórma com 4 placentas.

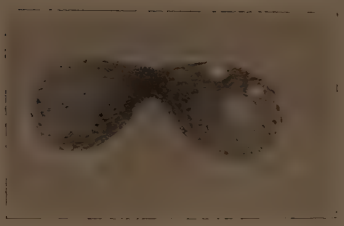
Fig. 28—Fórma com 4 placentas *(pl)* dispostas duas a duas.

Fig. 29—Fórma com 3 placentas *(pl)*.

Fig. 30—Fórmas com 2 placentas estiradas *(pl)* e com micronucleo unico e proveniente da divisão de fórmas com 4 placentas.



1



2

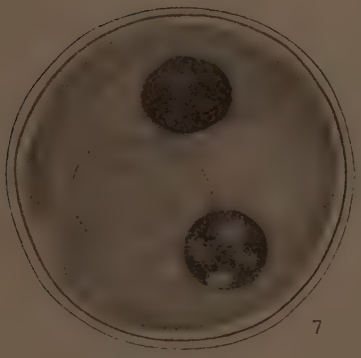
3

4

Dr. Julio Muniz del.

5

6



7

8

9

Dr. Julio Muniz del.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.

10

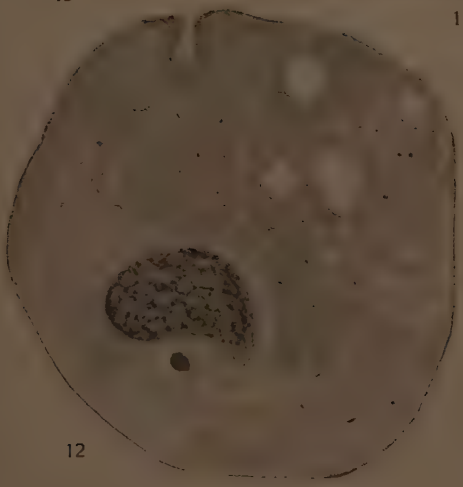
11

11 a

11 b

15

13



12

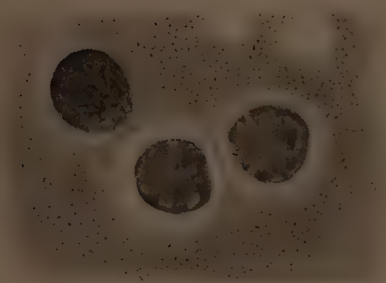
14

Dr. Julio Muniz del.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.

16

17



18

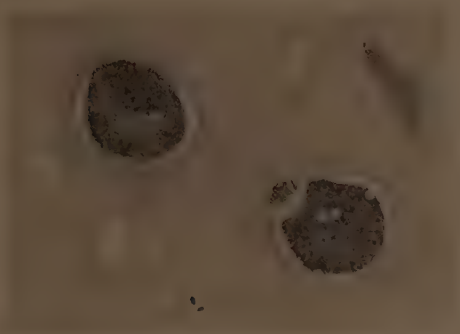
20

19

Dr. Julio Muniz del.

COMP. LITH. IRMÃOS PAULO R.O

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.



21

23

22

24

26

25

Dr. Julio Muniz del.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.

27

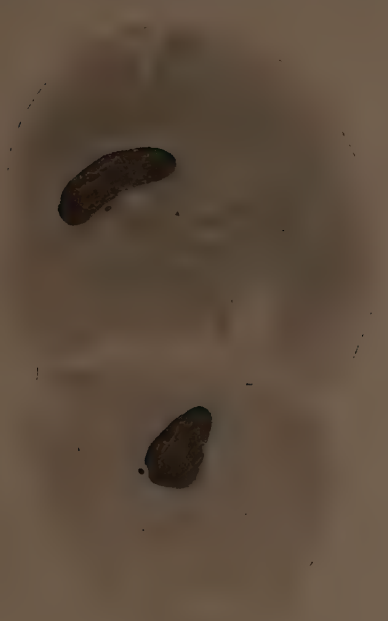
28

29

30

Dr. Julio Muniz del.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.



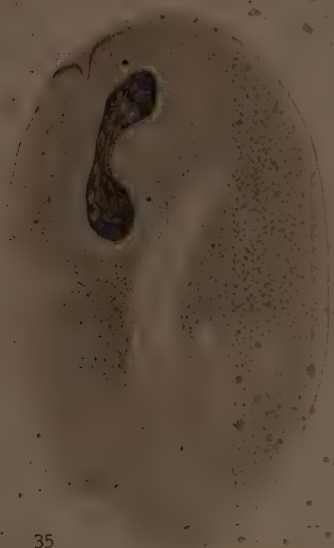
31

32

33

34

Dr. Julio Muniz del.



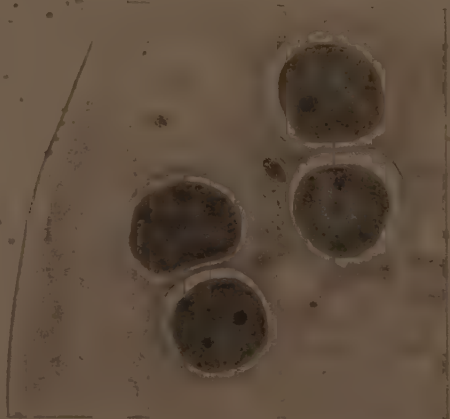
35

39

36

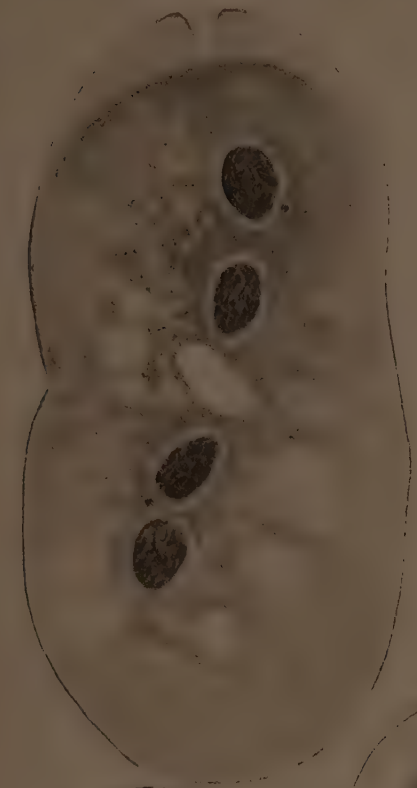
37

38



40

Dr. Julio Muniz del.



41

44

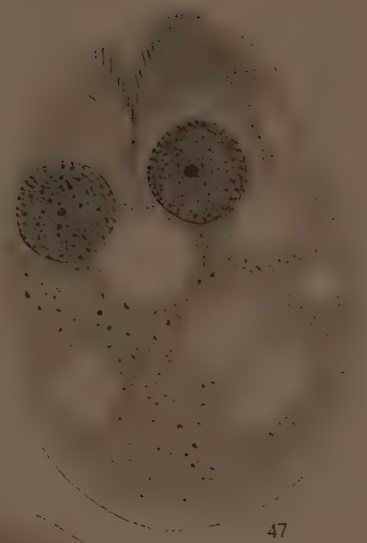
43 a

43

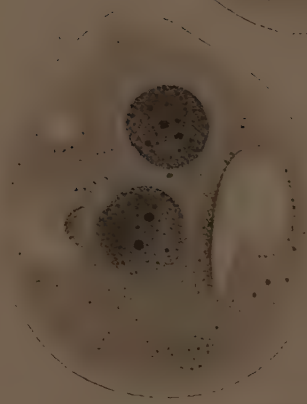
42

Dr. Julio Muniz del.

45

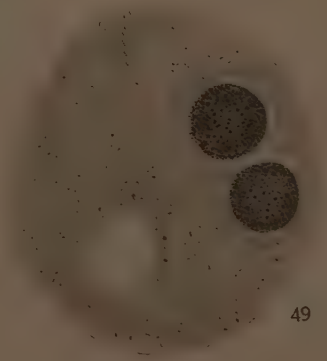


47



48

46



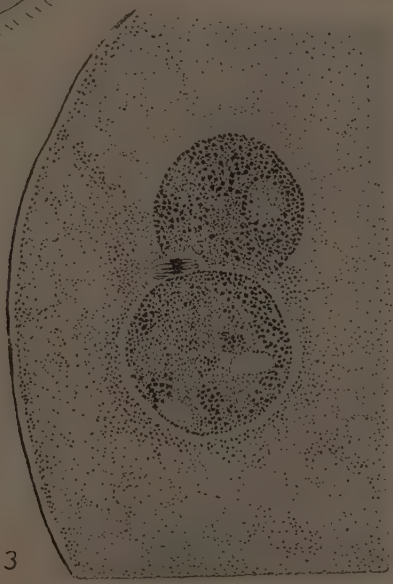
49

Dr. Julio Muniz del.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz : Endomixis em *Balantidium*.

1

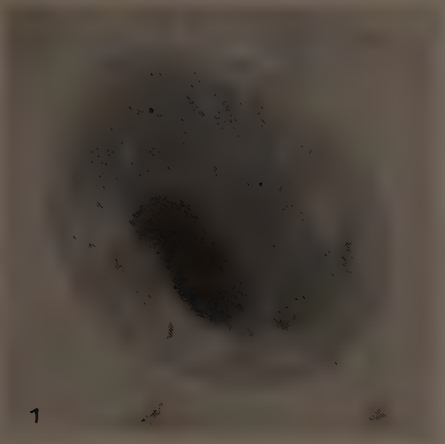
2

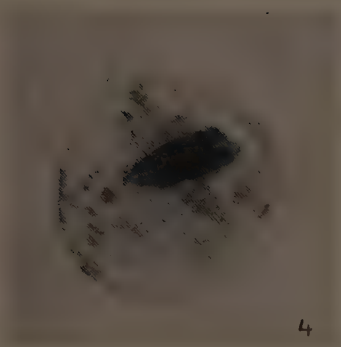


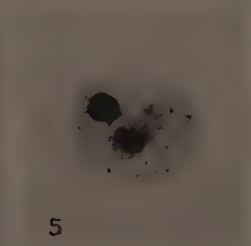
3

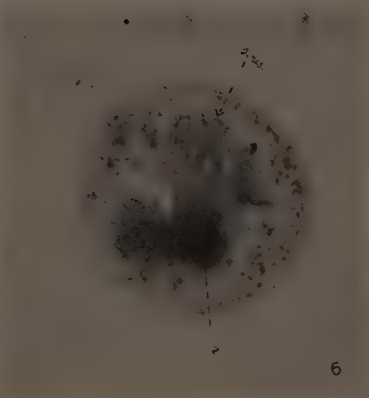
Dr. J. Muniz del.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.









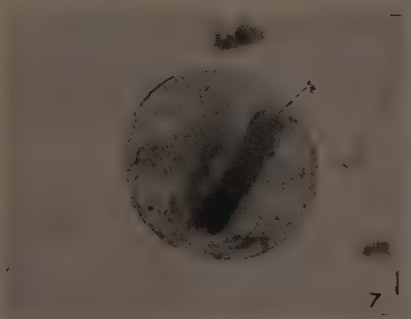
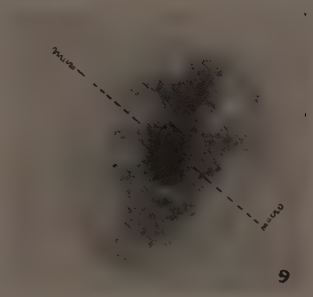
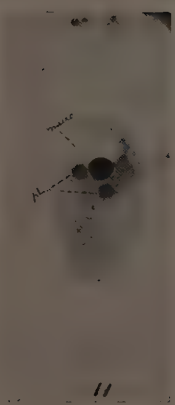
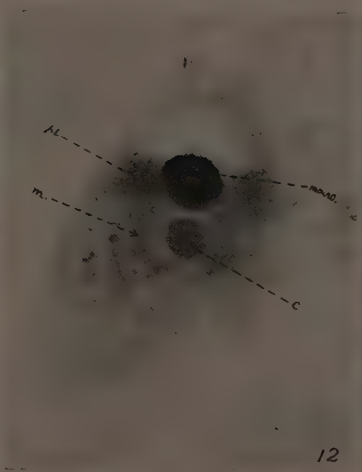


Photo J. Pinto.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.







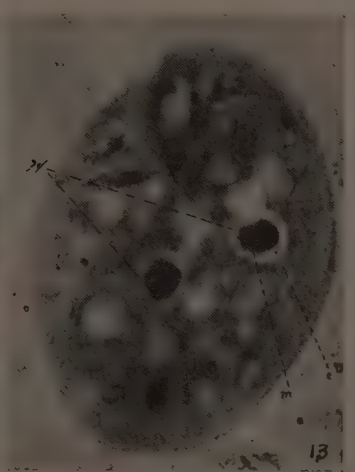


Photo J. Pinto.

Drs. A. Marques da Cunhà e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.

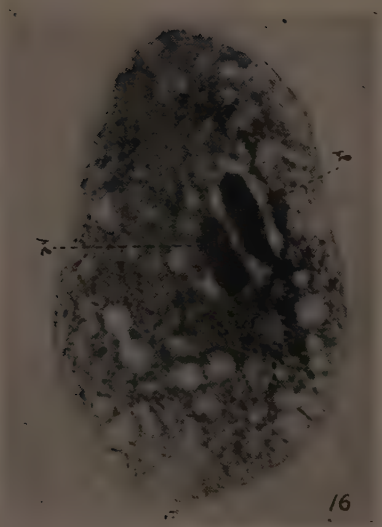
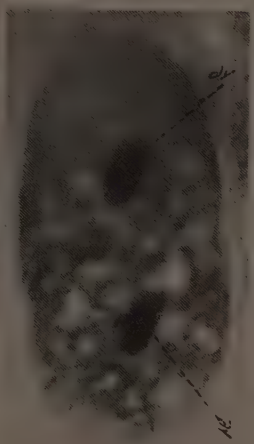


Photo J. Pinto.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.



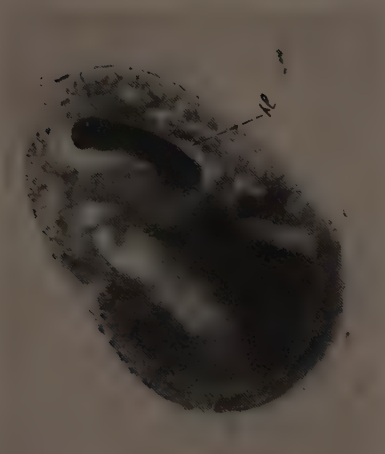
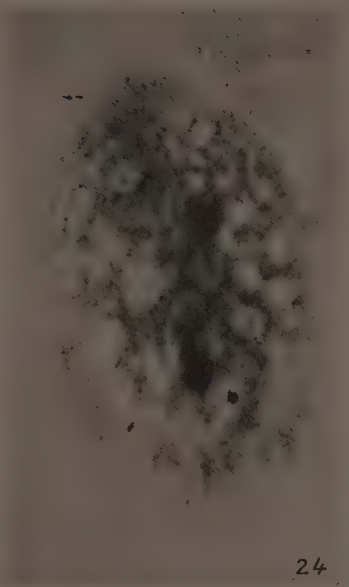


Photo J. Pinto.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.



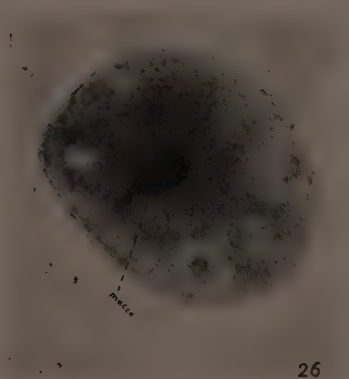
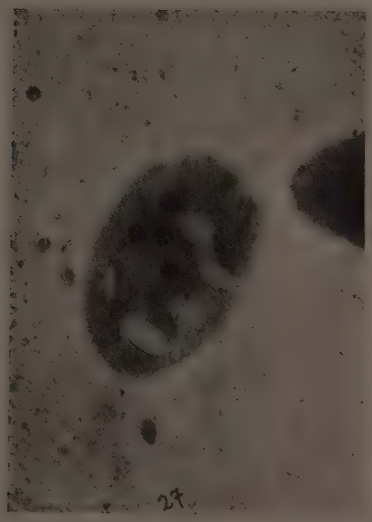
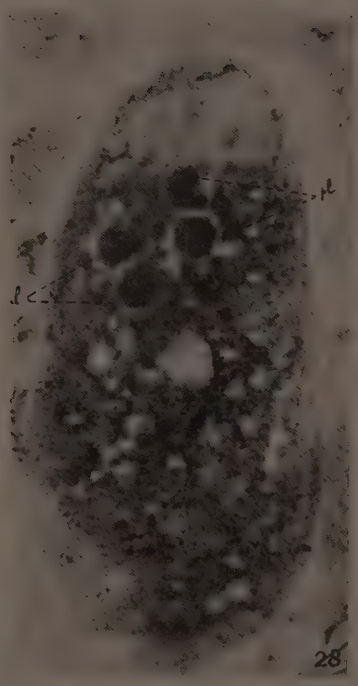
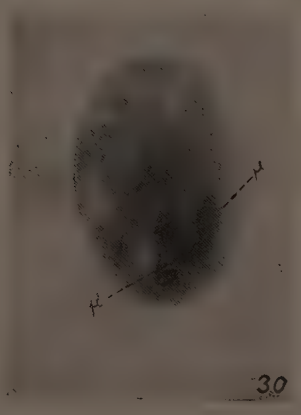


Photo J. Pinto.

Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.







Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz: Endomixis em *Balantidium*.

On the endomixis phenomenon in ciliata of the genus Balantidium (*)

Observations concerning the encystment of these ciliata and description of a new parasitic species of Macacus rhesus

by

DR. ARISTIDES MARQUES DA CUNHA and **DR. JULIO MUNIZ**

(With plates XLIX—LXV).

Summary

Pags.

Introduction 213
Material studied 214
Method of research 214
On the *Balantidium* species found in monkeys 216
On the parasitic *Balantidium* of *Macacus rhesus* 217
Study of the parasitic *Balantidium* cysts of *Macacus rhesus* 217
Study of the *Balantidium coli* cysts of swine 218
On the systematic position of *Balantidium* of *Macacus rhesus* 219
Balantidium simile n. sp. 219
The *endomixis* phenomenon in *Balantidium simile* 219
Phenomena preceding the *endomixis* process 221
Forms in which the *endomixis* process begins 222
Alterations undergone by the micronucleus from the beginning of the phenomenon until the formation of the two placentae 225
Alterations of the macronucleus during the phenomenon 225
Development of the placentae and formation of the micronucleus . . . 226
Reconstitution of the nuclear apparatus 227
Variations of the *endomixis* process 228
Case of formation of 4 placentae 229
Cases of 3 and 8 placentae 229
General considerations 229
Significance of the *endomixis* phenomenon 230

INTRODUCTION

In the present work we intend to relate the results of our researches regarding the *endomixis* phenomenon, which we had occasion to observe in some ciliata of the genus *Balantidium*, parasites of *Macacus rhesus;* this phenomenon up to now, was only known in free living ciliata.

In our studies of this *Balantidium* species, we have long since observed, like some others, the frequent appearan-

(*) Received for publication 7 March, 1930.

ce of certain forms in parasites of the same genus, but these forms never got a satisfactory interpretation. It was with the object of clearing up this point, that we began our researches, whereby we could verify, that these forms represent, by the side of others not yet observed, the phases of the same phenomenon, undergone by the ciliate during its life.

The results of our studies were briefly exposed at the meeting of Brazilian Society of Biology (Sociedade Brasileira de Biologia), on January 29th. of this year. We reserved for this essay the detailed description of the different phases of the phenomenon, as well as its documentation represented by diagrams, drawings and microphotographs. Apart from the purely descriptive part, we shall discuss the significance of the *endomixis* phenomenon in the evolutional cycle of the ciliata, for some of the facts, which we had occasion to observe, contribute, in our opinion, towards the elucidation of the mode, in which one should face this phenomenon.

Before entering into the description of the *endomixis* phenomenon, availing ourselves of this opportunity, we shall study the encystment process in this *Balantidium* species, and afterwards deal with the systematic position of this ciliate, in relation to the other already known species (in man, pig, *Cebus carayá* and *Cavia aperea*).

MATERIAL STUDIED

The material, used for the study of the *endomixis* phenomenon, came from *Macacus rhesus*, imported by the Oswaldo Cruz Institute (Instituto Oswaldo Cruz) from Hamburg for researches, regarding yellow fever. A high percentage of these animals showed itself to be parasited by ciliata of the *Balantidium* genus, and some of them very intensely.

We always prepared our slides with naturally discharged stools, as, usually, the imprisoned monkeys, on being removed from the cage, bristle up and, in that occasion, nearly always defecate, so that the obtaining of the material was made easy. In case this did not happen, we used an India-rubber tube to get the material. We never killed any animal to examine the stools but, for the better study of the phenomenon, one and the same animal was observed during some successive days, and in that lapse of time its faeces were repeatedly obtained on the same day, with an interval of a few hours. For the comparative study, we made great use of material containing *Balantidium*, got from man, pig, *Cebus carayá* and *Cavia aperea*, which are kept in the collections of the Protozoological Section of the Institute.

METHOD OF RESEARCH

The examination of fresh material. —This method proved to be but of little use for our study, for it only allowed us to suspect the existence of the *endomixis* phenomenon in the examined material, by the appearance of the small forms of the parasite, of a transparent aspect and almost quite devoid of inclusions, forms which generally represent only the initial state of the phenomenon. For the study of the alterations gone through by the macronucleus and the micronucleus during the different phases of the process, this method proved to be entirely useless, for the simple observation of the macronucleus in the fresh state is often difficult, on account of a great number of vacuoles or inclusions existing within the body of the ciliate. The use of an intense artificial light, as well as of lugol, which gives such good results to put in evidence the nucleus of other protozoa, did not benefit our study at all, because the latter impregnates the body inclusions of the ciliate so intensively, that it absolutely masks the observation of the nucleus.

Our material being very rich in *Balantidium*, we nearly always made smears of it on cover glass and immediately fixed them, when still humid. Sometimes, however, we employed also the massive fixation process. Of all the fixers used, the best results afforded were those obtained with the alcoholic Bouin or with the fluid of Dubosq-Brasil, of the following formula:

Alcohol at 80°	150 cc.
Formaldehyde	60 cc.
Crystallized acetic acid	15 cc.
Picric acid	1 gr.

It gave us much better results for the fixation not only of the vegetative forms, but especially of the cysts, than the sublimate-alcohol of Schaudinn. The material, having been distended into a thin layer on the cover glass, was still humid, when it was put into the fixating liquid for 2 or 3 hours. Afterwards, the cover-glass were transferred to a plate containing alcohol at 90°, where they remained till the complete elimination of the picric acid, meanwhile the alcohol being replaced 2 or 3 times. Subsequently, they were transferred into alcohol at 70°, and thence put into water to be, later on, submitted to coloration.

In our researches we used the following methods: nucleal reaction of Feulgen, hematoxylin of Delafield, borax-carmine, trioxyferrihemateine of Hansen, the classic process of Heidenhain, as well as the latter by us modified.

The nucleal reaction of Feulgen was useful very staining for the cysts colouring within them only the nucleus, but not the plasma, thus allowing the easy observation of the former. But to put in evidence the micronucleus and to study the transformations undergone by it during the *endomixis* phenomenon, the Feulgen nucleal reaction proved to be of no value, because the micronucleus remains almost unstained by this process.

Of all the processes, the classic method of Heidenhain was the one, which gave us the worst results, because the use of alum, as a differentiator, does not allow to obtain a good differentiation of the plasm, the latter keeping almost the same colour tonality as the nucleus. If, in order to obtain a greater contrast between both these elements, we prolonged the differentiation, the nucleus and the plasm remained equally uncoloured.

With a little modification of the latter process, however, we succeeded in obtaining very good slides, thus the study of the different phases, undergone by the ciliate during the *endomixis* process becoming much easier. The modification consists in replacing the differentiator, alum, by a dilution of 1 % hydrochloric acid in alcohol at 70°. After fixation by the Bouin and washing through alcohols at 90°, 70° and water, the cover slides were placed in iron alum solution at 3,5 %. After having been in the mordant for 12 hours, they were washed and put into the hematoxyline solution of Heidenhain. In the staining solution they remained for 5 or 6 hours, at laboratory temperature, but they could remain there even for 12 hours without any inconvenient.

Subsequently, the cover glasses were washed and subjected to the differentiator. As already mentioned, the latter is represented by a solution of 1 % hydrochloric acid in alcohol at 70°. Immediately after being placed in this solution, the preparations acquire a reddish colour, and gradually become discoloured. The differentiation must be followed under the microscope, having to be pursued until the protoplasm of the ciliate becomes almost quite colourless. This is of great importance, because, by washing with water after the differentiation, there occurs a change, inasmuch as the reddish

colour of the preparation is transformed into a dark blue, thereby reinforcing the ration. After remaining in runing water during a lapse of 2 hours, the preparations are deshydrated and mounted on balsam. Employing this process, we obtained splendid preparations, in which all the ciliate elements appear very well stained, even the micronucleus, so poorly coloured by the other processes.

The hematoxyline of Delafield and the borax-carmine, while giving very good results in the study of other ciliata, proved themselves to be of inconstant value and to be depending on the constitution of the faeces. So, when the latter are formed, to a great extent, by mucus, the *Balantidia* existing within are very well stained by these processes, otherwise the colorations obtained are poor and cannot be compared with those obtained by the above described process.

Following the advice of Dr. Gomes de Faria, we used the coloration with trioxyferrihemateine of Hansen (Trioxyeisenhämateinfärbung nach Hansen) with good results. It has the advantage of being a rapid process, coloring the ciliate nuclear apparatus in an intensive black.

The preparations, after being fixed when still humid, are placed in the staining solution for the lapse of 10 to 20 minutes. They are, afterwards, washed and differentiated by the hydrochloric alcohol. The differentiation has to be made quickly and to be followed under the microscope.

This process lends itself very well for the staining of the cysts, because, while colouring intensively the nucleus, it also allows to obtain with the differentiation a sharp contrast between this element and the other constitutive parts of the cyst.

Summarizing, we say, that for the study of *Balantidium* in the stage of vegetative life, none of the above mentioned coloration methods can replace that of Heidenhain, as long as use is made of a solution of 1 % hydrochloric acid in alcohol at 70° as a differentiator, instead of the ferric alum. This process is very useful, particularly for the study of the alterations, undergone by the micronucleus during the *endomixis* phenomenon.

ON THE *BALANTIDIUM* SPECIES FOUND IN MONKEYS

The presence of ciliata of the genus *Balantidium*, as parasites of various kinds of monkeys, was put in evidence by several authors, such as Brooks, Noc, Brumpt, Joyeux, and others. Nearly all of them identified the parasites met with, as being *Balantidium coli*. Hegner and Holmes observed in a monkey, proceeding from Brazil *(Cebus variegatus)*, a *Balantidium* and, in their work, noted some morphological differences existing between this *Balantidium* and *B. coli* without, however, regarding it as being a distinct species. In 1927, we described under the name of *Balantidium aragaoi* a new species of the genus, a parasite of *Cebus carayá*.

We, then, put in evidence that this parasite was different from *Balantidium coli*, principally because of the round shape of the macronucleus. In a later publication, without presenting any reason for his statement, Hegner considered this species as a doubtful one, regarding it as belonging to *Balantidium coli*.

In another work, we demonstrated the inconsistency of Hegner's point of view, for, since the macronucleus form of the species described by us was different from that showed by *Balantidium* of swine, and since the differential characteristic was constant, there was no reason to claim the identity of both species.

It must be borne in mind, that the round shape of the macronucleus in *Ba-*

lantidium aragaoi should not be regarded, as that of a peculiar phase in the evolution of this ciliate, for in all the material employed in our studies, we never met with macronucleus showing a different aspect, excepting in those forms, already described in our earlier work, possessing two roundish placencentae, and which we consider to be exconjugants.

Relying on this, we continue to consider *Balantidium aragaoi* as a good species, and we see no reason to modify our opinion, at least until it would be proved, that the neutral forms of *Balantidium coli* can show a macronucleus of a roundish shape, when changing of host.

ON THE *BALANTIDIUM* PARASITE OF *MACACUS RHESUS*

This ciliate was considered, up to the present time, as belonging to the species of coli. This point of view is supported not only by the morphological resemblance, showed by the vegetative forms of these ciliata, but also by the fact, first proved by Brumpt (1909) and later confirmed by Walker (1913), that the pig *Balantidium* can infect monkeys and vice versa.

At this point it is worth noting, that Brumpt dealt with Balantidia parasiting *Macacus cynomolgus*, observing that in one of his experiences this ciliate showed itself to be pathogenic for the swine, causing dysentery. It was, afterwards, confirmed by the autopsy which revealed lesions of the colon, equal to those met with in the human balantidiosis. Walker, in his work, does not state to what kind of monkeys he referred, affirming only that he succeeded in infecting some of these animals with material containing the *Balantidium* of man and pig. The post-mortem examination of two of these animals revealed the presence of this ciliate in the inner part of the colon walls.

Relying on our studies on the *Balantidium* species, parasite of the *Macacus rhesus*, we verified that this ciliate, in its vegetative forms does not present any important morphological characteristic, that would allow its differentiation from *Balantidium coli*. The dimensions of its neutral forms, as one can see in the table C of plate II which figures in this work, even being a little less than those given byy Mac Donald for *Balantidium coli*, show the relationship lengthwidth equal to 1,26, which number is very near to 1,30, found by the same author for the *Balantidium* species of swine.

Consequently, we see that the morphological criterium of only the vegetative form is not sufficient to separate the *Balantidium* of *Macacus rhesus* from *B. coli*. If that is so with the vegetative form, it is not the same with the forms of resistence, or cystic forms, as we shall see in the following lines.

STUDY OF THE CYSTS OF THE *BALANTIDIUM* PARASITE OF *MACACUS RHESUS*

Examining the stools of *Macacus rhesus*, it happens very often, that *Balantidium* cysts are to be met with, in some cases in great numbers, now together with vegetative forms of the ciliate, now when the latter are absent. The cysts, when ripe, present themselves, in the examination of fresh material, as having a roundish form, surrounded by a membrane of a twofold contour, refringent, its inner part being of granular aspect and containing inclusions. With lugol, there may be put in evidence, in the interior of the cyst, a large single mass or smaller grains coloured grey, seeming to be constituted of glycogen or a similar substance.

As far as we could observe, the encystment runs in the following fashion: the ciliate, which is to be encysted, presents itself as not being any more endowed with progressive movements, remaining as if if were fixed in a given

point, showing then intensive rotatory movements. It assumes a roundish shape, while a cystic membrane is being formed, at first thin, and later with a double contour. The striation, as well as the peristome remain as formerly and can be observed in the majority of the cysts. The rotatory movement, fairly intensive in the beginning of the encystment, is growing less, and is substituted, in a given period, by simple plasm streamings, even the latter entirely disappearing in the ripe cysts. The ciliate does not always entirely occupy the space limited by the cystic membrane, and often one can note a clear space between the membrane and the body of the ciliate.

In the stained preparations (Feulgen-Delafield), the initial forms of encystment show themselves roundish, with a membrane, that in some individuals can present itself devoid of a double contour. In its interior, one notes a macronucleus still bearing a kidneylike form, showing a clearly shaped micronucleus, placed in the hylus. Already here a perfectly individualized mass of reserve substance, that can vary in size, can be observed, as fully demonstrated by Feulgen's method of coloration. In a more advanced phase, we meet with the spindle-shaped macronucleus. By a sort of a strangulation of this spindle proceeds the formation of two new nuclei, which then take a roundish form. In this latter, as well as in the former phase, there is no more any possibility of putting the micronucleus into evidence.

The bi-nuclear form represents the ripe cyst, and it is that which predominates in the faeces of *Macacus rhesus*. Cysts with 4 nuclei are seldom found, they originate from those forms in which are observed 2 spindle shaped nuclei, forming, after division, 4 nuclei.

In our opinion, these cysts represent supernucleated forms, as occurring in other protozoa.

The average diameter of the cysts is 31,4 micra, as it can be seen in examining the data contained in table A of plate I; the average diameter of each one of both nuclei is of about 8 to 10 micra.

STUDY OF THE *BALANTIDIUM COLI* CYSTS OF PIG

The actually known data, concerning the cystic forms of *Balantidium coli*, are but few in number, and this can be verified by consulting the litterature on this subject. The existing works, particularly those of Hartmann, and of Dobell and O'Connor, describe the *Balantidium coli* cysts, as possessing only one nucleus, and resembling to those found in some vegetative forms. Dobell and O'Connor assign 50 to 60 micra for the cysts, whereas Hartmann assigns 40 micra.

In material, containing *Balantidium coli* cysts from pig and which was employed for our comparative study, the cysts presented themselves as being roundish, endowed with a thick membrane with a double contour and an average diameter of 38,8 micra, as it can be seen in plate I, table B. In the internal part of the cysts, in preparations stained with trioxyferrihemateine, there is found a plasm of granulous aspect, which can present in its interior one or more vacuoles. The mass of reserve substance, which is found in the *Balantidium* cystic forms of *Macacus rhesus*, is not met with in the present case.

The macronucleus is unique, and presents itself very elongate, curved, with distended extremities, often crossing the cyst almost from side to side. It measures from 20 to 30 micra in length. In the numerous forms, which we examined, it was not possible for us to meet with the micronucleus.

ON THE SYSTEMATIC POSITION OF THE *BALANTIDIUM* OF *MACACUS RHESUS*

From the above exposition, it can be seen that, while the vegetative forms of the *Balantidium*, parasite of *Macacus rhesus*, do not differ from those of *Balantidium coli*, either in size, or morphologically, the cystic forms of these two ciliata present sharp differences, which are mainly represented by the number of nuclei, that they possess when ripe, as well as by their dimensions.

These facts, here related, afford a strong argument against the identity of the *Balantidium*, found in spontaneous infections of *Macacus rhesus*, with *Balantidium coli*.

The fact that the monkey can be ininfected with the *Balantidium* of pig and *vice versa* cannot be considered, as a definite argument for claiming the identity of both parasites. For this, it would be necessary to prove, that the pig *Balantidium coli*, when living in swine, forms uninucleated cysts, and looses the property, when being a parasite of the monkey, where the cystic forms become bi-nucleated. The contrary should occur, when the swine is infected with the *Balantidium* of the monkey. Not only have such phenomena ever come under observation in relation to the *Balantidium*, but it is even difficult to conceive, that they should really ever happen, for a similar fact has never, up to the present date, been described in any other protozoon.

Based on the sharp difference shown by the encysted forms, we propose the creation of a new species for the *Balantidium* found in spontaneous infections of *Macacus rhesus* and forming cysts with 2 nuclei.

Balantidium simile n. sp.

Diagnosis.—A ciliate of the genus *Balantidium*. Vegetative forms resembling those of *Balantidium coli*, measuring from 61 to 86 micra in length by 51 to 70 micra in width. Relationship between length and width equal to 1.26. Roundish cysts, measuring from 23 to 38 micra in diameter, possessing, when ripe, 2 round nuclei (exceptionally 4), and one or more masses of reserve substance. This species is generally, not pathogenic for *Macacus rhesus*.

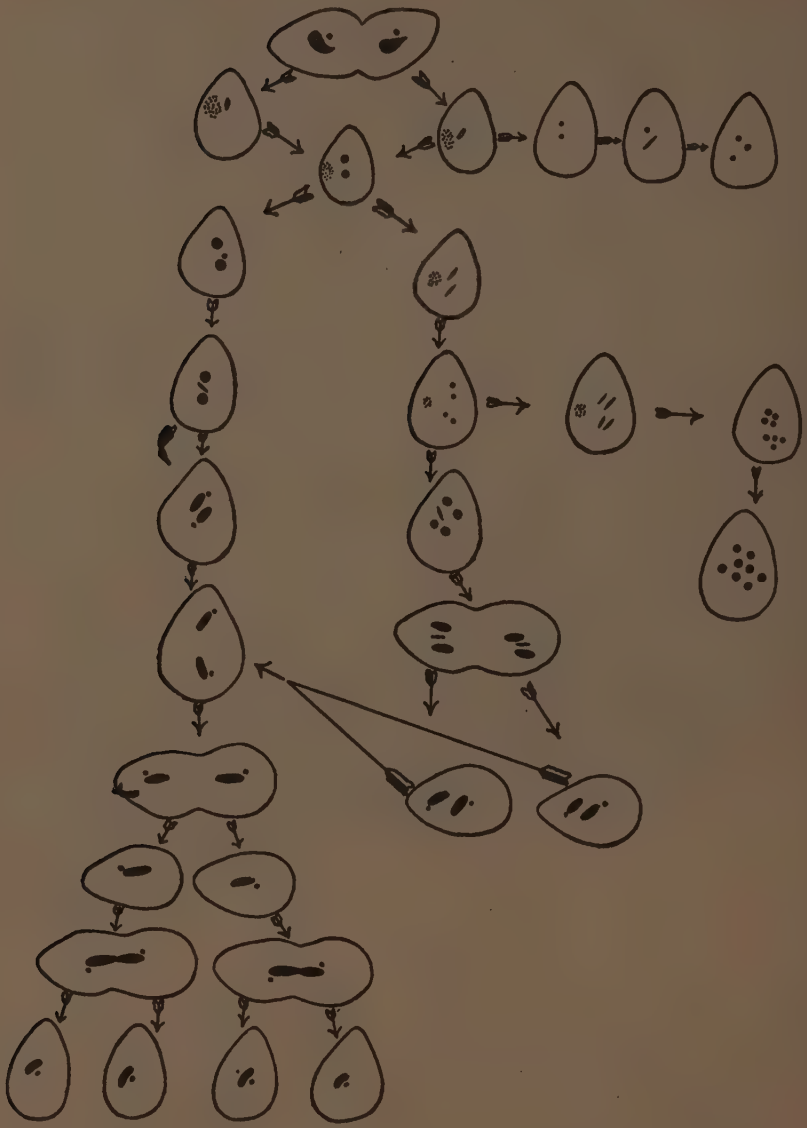
Habitat. — Caecum and colon of *Macacus rhesus*.

Plate I

DIMENSIONS OF THE CYSTS OF *BALANTIDIUM SIMILE*, OF *MACACUS RHESUS*	DIMENSIONS OF THE CYSTS OF *BALANTIDIUM COLI*, OF PIG
TABLE A	TABLE B
36,4 micra	43 micra
32,2 «	38,7 «
38,7 «	36,4 «
23,6 «	36,4 «
26,4 «	43,0 «
36,4 «	43,0 «
27,9 «	38,7 «
26,4 «	38,7 «
36,4 «	36,4 «
26,4 «	38,7 «
36,4 «	38,7 «
36,4 «	47,3 «
26,4 «	38,7 «
32,2 «	36,4 «
36,4 «	36,4 «
27,9 «	36,4 «
32,2 «	43,0 «
36,4 «	30,1 «
26,4 «	38,7 «
27,9 «	38,7 «
Average 31,4 micra	Average 38,8 micra

THE *ENDOMIXIS* PHENOMENON IN *BALANTIDIUM SIMILE*

The *endomixis* phenomenon was a first observed by Hertwig and later described by Woodruff and Erdmann, in



Schema of *endomixis* phenomenon in *Balantidium simile*.

Paramecium aurelia. A similar process has been demonstrated in other ciliata, the phenomenon occurring, either in the vegetative forms, or after the encystment of the protozoon. All the ciliata, in which this process was, up to now, observed, are free living protozoa.

Our observations concerning the existence of an identical process in the *Balantidium*, parasite of *Macacus rhesus*, constitutes the first observation of the phenomenon in parasitic ciliata.

According to what we could verify, this phenomenon is rather frequent in the case of the *Balantidium* of *Macacus rhesus*, and comes to pass, as in conjugation, under the form of real epidemics, the majority of the individuals taking part in it.

Notwithstanding the correlation, existing between the different phases of the process, correlation characterized by the predominance of a determined phase in the same material, it happens that one always meets, side by side with the predominant phase, and later or earlier, though less numerous, phases.

The phenomenon may occur again in the same animal, in a relatively short lapse of time; thus, in one of the monkeys, who afforded the material for our studies (*rhesus* nº 58), this phenomenon could be observed on January 10., 15. and 18 of this year.

The duration of the different phases of the phenomenon is greatly variable, the initial and the final phases of the process being the most rapid, while that of placenta lasting longer.

PHENOMENA PRECEDING THE *ENDOMIXIS* PROCESS

The existence of special phenomena preceding the *endomixis* process, analogous to what occurs in conjugation, was as yet indicated by no one, though foreseen by Dogiel.

In our case, we verified that the *endomixis* process is preceded by binary divisions, differing from those of neutral individuals in certain characteristic properties. In the course of our work, we shall name them progamic divisions, later on justifying the reason of this designation.

The exact number of the divisions could not be ascertained, though we can warrant, it was not less than two, such having been the number, we observed on all occasions. These two divisions differed from each other by the fact, that the resultants of one of them presented their nuclei (the macro— and micro-nucleus) in course of special alterations,—which we will study later on, and that indicate the beginning of the *endomixis* phenomenon, whereas the nuclei of the other division, in relation to the nuclear apparatus, only showed a simple reconstitution, which appears at the very end of the whole division process. The former, without doubt, represents the last of the progamic divisions, while the latter should be regarded, as representing an earlier division.

These two progamic divisions differ from those of the neutral forms, giving origin to much smaller individuals, as it can be seen by comparing the figure 4 of plate XIX and figures 10 and 11 plate LI.

The figure 4 of plate XLIX represent a form of division, found among a group exclusively constituted of neutral individuals, while the forms represented by the figures 10 and 11 of plate LI come from a material, in which there was found a great number of initial forms of the phenomenon.

The dimensions of each individual, taken in the final phase of the last progamic division, are similar to those of the individuals, in which the beginning of the *endomixis* phenomenon is observed. So, in the form represented by the figure 11 of plate LI the earlier individual

measured 43 micra in length by 28 micra in width, and the later 45 by 30 micra, numbers included within the extreme dimensions of those individuals, in which the *endomixis* process starts, i. e. from 36 to 46 micra in length by 25 to 36 micra in width.

Even before the complete separation of the two ciliata, resulting from the last progamic division, the micronucleus already presents itself much enlarged in volume, and, sometimes, even, as if it were in the beginning of the division, in which case it is accompanied by an initial degeneration of the macronucleus.

Jameson, in his work on the conjugation of *Balantidium coli,* mentions, that the phenomenon is preceded by the appearance of small individuals, which quickly reproduce themselves whilst decreasing in size, which fact is analogous to the we observed in our present case. Moreover, the dimensions, given by Jameson for the pre-conjugants, are, about the ssame as those found in our individuals ,in which the *endomixis* begins. These were the facts that moved us to identify the divisions, which precede the *endomixis,* with the progamic divisions.

FORMS IN WHICH THE *ENDOMIXIS* PHENOMENON BEGINS

The individuals, in which the *endomixis* phenomenon is about to take place and which are derived from the neutral individuals by means of a progamic division series, as exposed above, present certain characteristics, distinguishing them from the latter. Their dimensions are much smaller, as it can be clearly seen by comparing the data of table A and C of plate II, which is given farther on. In table C there are the dimensions of several neutral individuals, and in table A the dimensions of an equal number of individuals, in which the *endomixis* phenomenon is beginning. Their average dimensions are the following: 73,7 micra for the former and 41,4 micra for the latter, that is to say that the length of the former is 1,7 times that of the latter. By means of the data contained in these tables, one can verify that the forms, at the initial stage of the *endomixis* phenomenon, are more elongated, than the neutral forms, in conformity with the relationship between length and width which in the former is 1,46, while it is 1,26 in the latter.

The forms in which *endomixis* begins, being examined in fresh state, are seen to be, generally, devoid of food-inclusions, to present a hyaline appearance and to be very motile.

In regard to contractile vacuoles, there is in these forms, it seems, as far as we could observe, only one vacuole instead of two, that are found in the neutral individuals.

The micronucleus presents itself very enlarged in volume and, generally, placed near the macronucleus.

The macronucleus presents itself, as a rule, with one of the extremities acuminate, this being due to the failure of reconstitution after the progamic division, entering at once into degeneration, as it can be seen in the figures 12 and 13 of plate LI.

The characteristics, just now drawn attention to, are resembling those observed in the pre-conjugants of other ciliata, principally as to the enlargement of the micronucleus in volume.

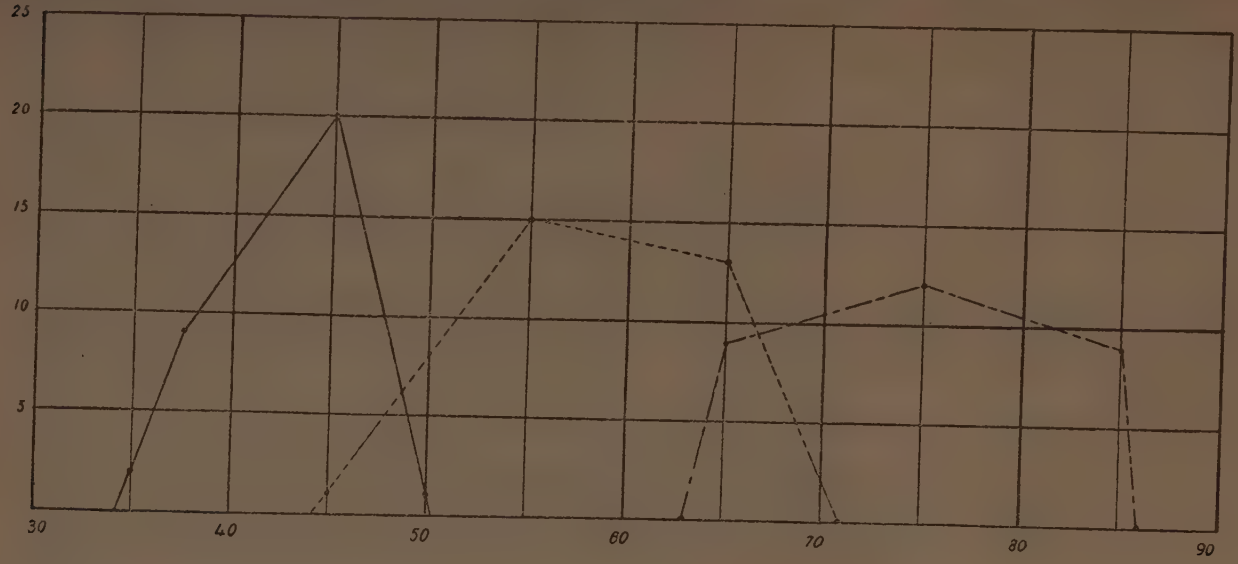
Moreover, if we make a comparison with the dimensions of the *Balantidium coli* pre-conjugants, given by Jameson (average dimension 45 × 21 micra), we see that they are sensibly equal to the dimensions of the forms, we have just studied.

Based on these facts, we consider the individuals, in which the *endomixis* phenomenon is beginning, as being pre-conjugants, and so we shall name then in the course of our present work.

Table II

C = *length*; L = *width*; R = *relation length-width*.

TABLE A PROGAMIC FORMS			TABLE B FORMS WIHT PLACENTAE			TABLE C NEUTRAL FORMS		
C	L	R	C	L	R	C	L	R
36 micra	30 micra	1,20	55 micra	35 micra	1,57	83 micra	58 micra	1,43
40 «	30 «	1,33	51 «	33 «	1,54	66 «	53 «	1,24
35 «	28 «	1,25	50 «	43 «	1,16	80 «	63 «	1,27
50 «	30 «	1,66	65 «	38 «	1,71	60 «	53 «	1,13
48 «	30 «	1,60	56 «	43 «	1,30	83 «	70 «	1,18
38 «	31 «	1,22	45 «	31 «	1,45	61 «	51 «	1,19
35 «	26 «	1,34	60 «	35 «	1,71	86 «	63 «	1,36
45 «	31 «	1,45	58 «	36 «	1,61	66 «	56 «	1,17
41 «	32 «	1,28	63 «	38 «	1,65	68 «	53 «	1,28
45 «	26 «	1,73	51 «	30 «	1,70	66 «	58 «	1,13
45 «	28 «	1,60	56 «	35 «	1,60	80 «	63 «	1,27
38 «	23 «	1,65	56 «	31 «	1,80	83 «	65 «	1,27
40 «	26 «	1,53	51 «	30 «	1,70	86 «	70 «	1,22
46 «	25 «	1,84	63 «	36 «	1,75	81 «	56 «	1,44
40 «	35 «	1,14	60 «	31 «	1,93	70 «	58 «	1,20
43 «	30 «	1,43	51 «	35 «	1,45	73 «	55 «	1,32
45 «	36 «	1,25	50 «	43 «	1,16	76 «	61 «	1,24
40 «	30 «	1,33	50 «	33 «	1,51	76 «	58 «	1,31
46 «	30 «	1,53	51 «	35 «	1,45	70 «	58 «	1,20
36 «	30 «	1,20	63 «	35 «	1,80	73 «	61 «	1,19
46 «	33 «	1,39	71 «	38 «	1,86	83 «	60 «	1,38
41 «	25 «	1,64	51 «	36 «	1,41	63 «	45 «	1,40
41 «	28 «	1,46	53 «	40 «	1,32	68 «	53 «	1,28
38 «	33 «	1,15	60 «	36 «	1,66	76 «	53 «	1,43
36 «	25 «	1,44	66 «	38 «	1,73	73 «	60 «	1,21
40 «	28 «	1,43	66 «	36 «	1,83	71 «	58 «	1,22
36 «	23 «	1,56	65 «	36 «	1,80	71 «	56 «	1,26
46 «	28 «	1,64	66 «	36 «	1,83	76 «	61 «	1,24
40 «	26 «	1,53	63 «	38 «	1,65	75 «	56 «	1,33
46 «	23 «	2,00	68 «	40 «	1,70	68 «	61 «	1,11
			Average					
41,4 micra	28,6 micra	1,46	57,8 micra	36 micra	1,61	73,7 micra	58 micra	1,26



GRAPHIC OF THE DIMENSIONS OF *BALANTIDIUM SIMILE* DURING THE SEVERAL PHASES OF THE *ENDOMIXIS* PHENOMENON AS, WELL AS OF THE NEUTRAL FORMS.

The abcissae represent the length of the ciliate in micra and the ordinates the number of ciliates of each dimension.

——————— Individuals at the inicial phase of the phenomenon.
– – – – – – – Individuals with 2 placentae.
—— – —— – —— Neutral individuals.

ALTERATIONS UNDERGONE BY THE MICRONUCLEUS, FROM THE BEGINNING OF THE PHENOMENON UNTIL THE FORMATION OF THE TWO PLACENTAE

The first modification, undergone by the micronucleus, is its enlargement in volume, which begins, as we have already seen above, even before the separation of the pre-conjugants, after the last progamic division.

The micronucleus, then, presents itself as having the form of a sphere, showing a small number of minute chromatin granules within an achromatic mass. The micronucleus is generally situated near the macronucleus, though, sometimes, they may be placed at a certain distance one from the other.

The micronucleus enters, afterwards, into division by mitosis, forming an achromatic spindle and presenting an equatorial plate constituted of chromosomes, the number of which it altogether was impossible to determine. This is the most common phase one meets with in the initial period of the phenomenon, represented by the figure 15, plate LI.

Subsequently, occurs the division of the equatorial plate, followed by the migration towards the poles of the plates resulting from this division. This phenomenon is accompanied by the elongation of the spindle and by the strangulation of its middle part (figure 16, plate LII).

Immediately after the separation of the two nuclei, resulting from this division, and even before their complete reconstitution, there is already observed an enlargement in volume of these nuclei.

This volume enlargement originates principally, from the linin-reticulum; the nuclei, then, present themselves as being very poor in chromatin, which, under the form of granules, is spread over the fibres of this network (figure 17, plate LII).

Taking into account its infrequency in our observations, we consider this phase of the process as proceeding most rapidly.

The nuclei resulting from the division of the micronucleus, on growing up, assume the figure of two placentae, as it is observed in other ciliata.

It was more seldom that we met with forms presenting two mitoses of the micronucleus. As a result of our researches, we may conclude that these latter forms correspond to the special and rare case of the formation of 4 placentae.

In the predominating process, i. e. in the process of formation of 2 placentae, there is only one mitosis of the micronucleus.

If in this case there were 2 mitoses, they would give origin to 4 nuclei, and 2 of them should, of course, degenerate, whereby they would have formed the placentae by means of the other two. It happens, however, that we never observed any micronucleus in course of degeneration, nor have we ever seen their persistence at the side of the two placentae, at the same time conserving their primitive appearance. There can also be observed a form, similar to that represented by the figure 17 of plate LII, where the two nuclei, resulting from the micronucleus mitosis, still present some marks of this division, and already in course of being transformed into placentae. Moreover, the forms of only one mitosis are those that predominate in our material, and the same occurs with the forms of two placentae.

ALTERATIONS OF THE MACRONUCLEUS DURING THE PHENOMENON

The degeneration of the macronucleus, sometimes, begins even before the separation of the two pre-conjugants, resulting from the last progamic division. The macronucleus, after this division, does not attain its reconstitution, as it is shown by the persistence of an acumi-

nate extremity,—a trace of the recent division—, in the initial forms of the phemenon, where the first marks of its degeneration are observed.

The degeneration is recognized by the loosening of the linin-reticulum and by the appearance of intensely coloured granules.

These granules are, sometimes, condensed at the periphery of the macronucleus, whose central part presents a vacuolated appearance.

While these granules are growing in volume, their number is decreasing, which fact may be explained by their fusion. At the same time, there is, as it were, a volume retraction of the macronucleus. In a more advanced stage the macronucleus is represented by a unique mass, which is round, compact, intensely stained and of much smaller dimensions, than the primitive ones of the macronucleus. This mass is progressively decreasing in size, till its complete disappearance. Exceptionally there is observed a fragmentation of the macronucleus, when in degeneration. The complete disappearance of the macronucleus comes about during the phase of growth of the placentae.

DEVELOPMENT OF THE PLACENTAE AND FORMATION OF THE MICRONUCLEUS

According to our observation, no sooner had the division of the micronucleus finished, than the resulting nuclei grow rapidly, being transformed into placentae. The nuclei, then, show themselves to be constituted by a linin-reticulum, over whose fibres the chromatin is spread, under the form of minute granules (figure 17, plate LII). The evolution of the placenta comes about by the rapid growth of the linin-reticulum and of the membrane, both at once acquiring the dimensions of a completely developped placenta. The increase of the chromatin is less rapid, and it comes about by the increase of volume of the granules, which, at the beginning, are condensed in the central part, being surrounded by a clear space, exclusively, constituted of achromatic substance, and separated by a sharp membrane from the plasm. The total size of one of these forms measures 10 micra, whilst the central part, which is occupied by the chromatin, scarcely measures 5 micra. This central chromatic mass increases gradually, until it fills almost the whole space, limited by the placental membrane. This growth is due to the increase of the chromatin, for this central mass, at first scarcely colorable, shows itself intensely stained, when quite grown up. The placentae, completely developped, measure from 8 to 12 micra in diameter, presenting, then, the following structure: a central chromatic body, almost filling the whole clear space, which is limited by the membrane. This body shows itself, as being, generally, roundish, though often of an irregular contour, having in its inner part the chromatin, irregularly spread, under the form of minute granules, as well as under the form of larger masses, often presenting themselves, as being surrounded by a small clear halo. At the side of the chromatin granules, in the inner part of this body, there are noted almost always small vacuoles, variable in number, placed either at the most internal part, or at the periphery, this latter circumstance contributing to give the contour an irregular appearance.

During the various growth phases of the placenta, the micronucleus is never seen; we may assert this fact with certainty, on the strength of our observations in hundreds of forms.

The placentae, at first distant, approach, afterwards, from one another, until they are placed one at the side of the other.

The formation of the micronucleus comes about at the cost of one of the

placentae, as it is clearly shown by the figures 19 and 20 of plate LII.

There we see the micronucleus, being less intensely coloured, than the placenta, the former being lodged in a depression of the latter, and still envelopped by the placental membrane.

The micronucleus is expelled out of the placenta, when completely constituted, and it was not possible for us to observe, how it is being formed in the internal part of the placenta, owing to the presence of the above mentioned chromatin masses.

As a rule, the expulsion of the micronucleus comes about, when the placentae are close one to the other, but in some cases this happens, when they are still distant one from each other (figures 21 and 22 of plate LIII.

During the approaching of the placentae and the formation of the micronucleus, the latter is, usually, placed between the former.

The placentae, then, lose their spheric shape, and their faces, turned to each other, assume a flattened appearance, or even show a concavity, which is, as a rule, of lenticular form, and in which the micronucleus is lodged. This lenticular concavity is of such appearane, as if it were lined by the membranes of ths two placentae.

During this period, the ciliate increases, mainly, in length, measuring 45 to 71 micra in length by 30 to 43 in breadth or having an average dimension of 57,8 × 36. The relationship between length and width, whose average value in the pre-conjugants was 1,46, assumes here the value of 1,61, thus proving our assertion.

The forms showing two placentae already developped with or without a micronucleus, are of more frequent observation, which fact indicates, that this phase is the most lasting of the *endomixis* process.

RECONSTITUTION OF THE NUCLEAR APPARATUS

The transformations, undergone by the nuclear apparatus, from the phase, we have just now studied, until it acquires the typical structure, presented by the neutral forms, are accompanied by two divisions of the ciliate, so that by one individual, going through the *endomixis* phenomenon, there originate four neutral individuals.

The process begins with the division of the micronucleus, which comes about through mitosis, and differs from that, which was earlier described, owing the spindle being smaller.

The division of the micronucleus comes, generally, about, when the two placentae are near each other, whereby the spindle is placed between them.

In case of the micronucleus being formed long before the approaching of the placentae, the division of the micronucleus may begin, when they are still distant.

A division once finished, each resulting micronucleus takes its place near each placenta. The latter, then, gets lengthened, taking the form of a ribbon, whose length is 2,5 to 3 times its breadth.

At first, the placentae remain side by side, streched in parallel lines.
rallel lines.

Each of the micronuclei is, then, placed near the extremity of each placenta, but in opposite directions.

The placentae, thus elongated, migrate, each moving towards one of the extremities of the ciliate. This migration proceeds in the direction of the larger dimension of the placentae, the micronucleus, usually, occupying the extremity, towards which the migration is directed.

In somes cases, the micronucleus may be situated by the side of the extremity, always, however, quite close to it.

At the same time, there appear the marks of the plasm division, which grow

more accentuated in proportion to the migration of the placentae, until the complete separation of the two ciliata, each of which possesses one elongated, ribbon-like placenta and one micronucleus, situated near one of the extremities of the same placenta.

The structure of the placenta, in these forms, is very characteristic. the chromatin being spread in the form of threads, which go over the greater diameter of the placenta, making the impression of being stretched, as if entering into division. Through such characteristics, these forms may be easily distinguished from the neutral individuals.

The individuals, thus formed, enter into a new division, beginning with the micronucleus, every one of the division resultants placing itself near the extremities of the placenta, whose distension is more accentuated in this moment.

Then, there comes about the structure of the middle part of the placenta till its complete division, accompanied by the plasm division, thus two ciliata being formed, each one with a micronucleus and a placenta; the latter is reconstituted, by acquiring the appearance of the macronucleus of neutral individuals.

This second division is distinct from the division of the neutral forms, not only by its appearance in the material, where individuals with 2 placentae predominate side by side with forms of the preceding division, but also by other characteristics, by which it may be recognized with certainly, and which we are about to accurately describe.

Thus it is, that, in the division of the vegetative forms, the distended macronucleus is situated in the middle part of the ciliate, its divisional plane coinciding with that of the plasm. This does not always happen in the final division of the *endomixis* process, because the distended placenta, usually, remains near one of the ciliate extremities, and the divisional plane of the placenta does not coincide with that of the plasm, neither is there a perfect correlation between these two processes.

Moreover, in these forms the macronucleus, when in course of division, shows to be, in relation to the plasm, of a much smaller volume, than in the corresponding forms of division of the neutral individuals.

That, which we have just asserted, is rendered more evident by comparing the figures 4 of plate XLIX and 32, 33, 34, plate LV and the microphotographs 2, plate LX, 21, 22, plate LXIII, 23, 24, 25, plate LXIV, than by any description.

VARIATIONS OF THE *ENDOMIXIS* PROCESS

The *endomixis* phenomenon, though, in the majority of cases, coming abouut, as just now described, may in a small number of individuals present some variations, constituted by forming a greater number of placentae, than in the usual forms.

The most frequent of these variations is that, in which 4 placentae are formed, and, by way of exception, there can be seen also forms of 3 and 8 placentae.

We were not able to determine the pecentage of frequency of the variations, for even in the forms with 4 placentae, the most common case of variants, we were obliged to observe a great deal one or more preparations full of bi-placented individuals, in order to meet with a few forms of this variant.

As regards the two other cases, of 3 and of 8 placentae, it is sufficient to mention, by way of giving an idea of its extreme rarely, that in all our material we found forms of 8 placentae only in two cases, and only a single case of 3.

It is, therefore, that, as far as the study of the variants is concerned, only the first, that is of 4 placentae, could be more studied.

CASES OF FORMATION OF 4 PLACENTAE

As it was already stated in: «Alterations undergone by the micronucleus, from the beginning of the phenomenon until the formation of the placentae», we seldom met with forms, presenting 2 mitoses of the micronucleus. We, then, explained the reasons, that moved us not to include these forms into the usual course of the phenomenon, and to consider them, as the initial stage of the variation, in which there comes about the formation of 4 placentae.

From these two mitoses, there result 4 micronuclei, which, on growing, are transformed into placentae. These latter, as a rule, present themselves at the middle or posterior part of the ciliate, and, at a more advanced stage, they arrange themselves in groups of two.

The micronucleus is unique, as in the case of 2 placentae, being formed at the cost of one of the placentae. This micronucleus divides itself, forming two others.

Each of the groups, being constituted by one micronucleus, resulting from that division, and two placentae, diverges towards the opposite extremities of the ciliate, when the division of the plasm is beginning. The latter being finished, each resulting ciliate remains with two placentae and one micronucleus, which enters into division, as in the case of formation of 2 placentae.

CASES OF 3 AND OF 8 PLACENTAE

Of the two cases with 8 placentae, we could observe only such forms, in which the placentae are already formed, without having seen any form, preceding its formation, nor its further evolution towards neutral individuals.

Nevertheless, we believe, that it is not difficult to explain the origin of the forms, observed by us in these two cases.

When the formation of 3 placentae comes about, after the first mitosis of the micronucleus, one of the newly resulting nuclei at once evolves towards a placenta, while the other undergoes a new division.

In the case of 8 placentae, we observed 3 successive divisions of the micronucleus, with 8 resulting nuclei, which, afterwards, evolve towards placentae.

GENERAL CONSIDERATIONS

If we consider the essential side of the phenomenon described in the present work, we see that it consists of the substitution of the primitive macronucleus, which degenerates, by a new one, formed at the cost of the micronucleus, which fact comes about totally without the concourse of any other individual and without the fusion of chromatin. Thus, no doubt can remain that here we are dealing with a phenomenon of *endomixis*.

On two points the phenomenon, just observed, differs from the existing descriptions of an identical process in other ciliata.

The first point concerns the existence,—prior to the beginning of the process—, of divisions of the ciliate, whereby there result especial forms, different from the neutral ones, identified by us with the pre-conjugants.

This fact, though not yet signalized, has to be considered not as a peculiar trait of the present case, but as a general process, necessary for the realisation of the phenomenon.

The second point concerns the transformation of the nuclei, resulting from the division of the micronucleus, into placentae, as well the later formation of a new micronucleus at the cost of one of the placentae.

In the case of *Paramecium* and of other ciliata, the nuclei, resulting from the division of the micronucleus, have a different evolution, for one is transformed into a placenta, and the other remains as a micronucleus. In the case of *Balantidium*, this does not happen, because all nuclei resulting from the division of the micronucleus are, as we saw, transformed into placentae, thus giving origin to forms, in which there is no micronucleus. The latter is, afterwards, formed at the cost of one of the placentae.

The phase, in which two placentae, with or without micronucleus, are observed, being the most lasting of the whole process and, therefore, the most frequent to be met with, was already observed by others, in ciliata of the genus *Balantidium*. Thus, Hegner and Holmes have found similar forms in *Balantidium*, parasite of *Cebus variegatus*, interpreting them as being individuals, in which there had come about the division of the macronucleus without a simultaneous division of the plasm.

In some of these forms, they observed the division of the micronucleus, and regarded it as an argument, favourable to their interpretation.

The chromatin masses, often observed in the inner part of the placentae, were considered as being chromosomes, compared with the trophic chromosomes of the Opalinidae.

Felix Pritze observed identical forms in the *Balantidium*, parasite of swine, giving them the same interpretation.

In our work on *Balantidium aragaoi*, we also noted forms with 2 placentae, interpreting them as being pre-conjugants.

The results of the present work, as well as those of Jameson's work on the conjugation of *Balantidium coli*, show the rightness of our interpretation and, at the same time, how much far from the truth is the point of view of the above cited authors.

Now, we had occasion to meet with individuals presenting two placentae, in material with *Balantidiuum coli*, coming either from man or from swine. The same fact was observed in other ciliata: in *Isotricha ruminantium* and *Bütschlia parva* by Dogiel, and in *Paraisotricha acuminata* by us.

From the observation of forms with 2 placentae, one cannot conclude by the existence of the *endomixis* phenomenon, because they also occur in the conjugation. In the special case of *Balantidium*, similar forms were observed by Jameson in ex-conjugants. Jameson says that the two pronuclei do not fuse and that there are signs, that one minor corpuscle, considered by him as being the micronucleus, is formed at the expense of the former, in an indetermined manner.

From this author's studies on the conjugation of *Balantidium*, there can be seen a likeness existing between the two phenomena, a fact, by the way, already observed in other ciliata.

Jameson admits the fusion of the two placentae, in order to form the macronucleus. In our case, it is out of all doubt, that this does not occur, and it is probable that the same may happen in the conjugation, which will have to be decided by new research.

The formation of more than one placenta and the posterior plasm division for the distribution of them in as many individuals as there are placentae, is already known in other ciliata, in the conjugation as well as in the *endomixis*. This was interpreted by Schweyer as a case of polyembryony, such as it occurs in certain metazoa.

SIGNIFICANCE OF THE *ENDOMIXIS* PHENOMENON

Hertwig, who was the first to observe the *endomixis* process, considered

it as a parthenogenetic phenomenon, and so he denominated it.

Later on, Woodruff and Erdmann, who made a detailed study of this phenomenon in *Paramecium aurelia,* are not favourably inclined towards this opinion, creating therefore the new term *endomixis* for the designation of the phenomenon.

The authors, who consider the *endomixis* as a case of parthenogenesis, base their opinion on the likeness, presented by this phenomenon, with the conjugation in all its phases, except in the division of reduction of the nuclei by means of exchange and fusion, that is to say, in the phases characterising the phenomenon of fertilization.

Woodruff and Erdmann think that, in order to consider the *endomixis* phenomenon as being a case of parthenogenesis, it would be necessary to demonstrate the existence in the *endomixis* of a division of reduction, and even more, that the micronucleus, in which the phenomenon comes about, corresponds to the nucleus of a gamete.

The fact of the non-existence of a third micronucleus division in the *endomixis* phenomenon of *Paramecium aurelia* does not prove the non-existence of a reduction of the number of chromosomes, for, as we know, this reduction does not often come about in the third division, but indeed in the preceding division, as it is the case in *Didinium nasutum,* studied by Prandtl, and in *Chilodon uncinatus,* according to Enriques.

Even if the non-existence of reduction in the *endomixis* were demonstrated, even then, there would be no reason for not considering it as parthenogenesis, so long as Strassburger's opinion is not adopted.

This opinion is not followed by the majority of the authors, and hence Winkler divides the parthenogenesis in two groups: one in which there is no reduction, the *somatic* or *diploid parthenogenesis,* and the other in which there is reduction, the *generative* or *haploid parthenogenesis.*

To us the necessity of reduction in the parthenogenetic phenomenon does not seem reasonable, because it is not observed in many cases of gametic formation, coming about only after the fertilization, as in the case of the Coccidia, to cite but one example among the protozoa.

Erdmann, in a later work, already considers the endomixis phenomenon as being a case of diploid parthenogenesis.

The demonstration made by Dogiel of the existence, prior to the conjugation phenomenon, of special divisions (progamic divisions), from which result individuals of particular characteristics, different from those of the neutral forms, and destined for the conjugation *(preconjugants),* came out to alter, to a certain extent, the similarity between the two phenomena, because this fact has not been observed in the *endomixis.*

As we saw, one of the main facts of our researches is exactly the demonstration of the existence, prior to the *endomixis* phenomenon, of divisions, from which results individuals, different from the neutral ones, and in which the phenomenon comes about. Moreover, we showed how, in our case, these individuals are identical with the pre-conjugants of the same ciliate, as it can be seen by comparing the forms, by us studied, with those, described by Jameson, in the conjugation of *Balantidium.*

This fact, as we already said, should not be considered as peculiar to the case of the *Balantidium* studied by us, and indeed, as a general process, necessary the accomplishment of the endomixis phenomenon. If it had not yet been observed it is because, up to now, the *endomixis* phenomenon was not yet known

in any parasitic ciliate, wherein the difference between the pre-conjugants and the neutral individuals is more accentuated.

We, thus, see that the *endomixis* phenomenon comes about not in a somatic cell, but in a pre-conjugant, that is to say, in a form of ciliate, destined for the fertilization, and which furnishes a strong argument in favour of those, who consider the *endomixis* phenomenon as a case of parthenogenesis.

Explanation of the plates

PLATE XLIX

Balantidium simile.

Fig. 1—Neutral form.

Figs. 2 and 3—Nuclear apparatus of a neutral individual, showing the correlative positions of the macronucleus.

Fig. 4—Neutral individual during division. One of the micronuclei, being situated under the macronucleus, is not represented.

PLATE L

Fig. 5—Recently encysted form, still showing the micronucleus.

Fig. 6—Cystic form with the nucleus during division.

Fig. 7—Ripe cyst, showing 2 nuclei and a mass of reserve substance (stained by Feulgen's).

Fig. 8—Cyst with the two nuclei during division.

Fig. 9—Cysts with 4 nuclei (overnucleated form, stained by Feulgen's).

PLATE LI

Endomixis in *Balantidium simile.*

Fig. 10—Progamic division.

Fig. 11—Final stage of the last progamic division.

Figs. 11a and 11b—Nuclear apparatus of the preceding form, more enlarged, showing the micronucleus increased in volume, already in the beginning of division, the macronucleus being in course of degeneration.

Fig. 12—A form showing the begining of the endomixis phenomenon. the micronucleus being enlarged in size; the macronucleus is in the begining of degeneration, presenting one of the extremities still tapered, a trace of the recent division (last progamic division).

Fig. 13—Nuclear apparatus of a form when in the beginning of the phenomenon. Micronucleus during mitosis; macronucleus in degeneration presenting one tapered extremity.

Fig. 14—Micronucleus during mitosis; macronucleus in advanced degeneration showing the peripheral arrangement of the chromatin.

Fig. 15—Mitosis of the micronucleus showing the equatorial plate.

PLATE LII

Fig. 16—Advanced division stage of the micronucleus; the macronucleus in degeneration.

Fig. 17—Both nuclei resulting from the division of the micronucleus, still with traces of that division and already in course of growth in order to be transformed into placentae; macronucleus in degeneration.

Fig. 18—Forms with two placentae and the macronucleus in advanced degeneration.

Figs. 19 and 20—Formation of the micronucleus by means of the placentae.

PLATE LIII

Figs. 21 and 22—Already formed micro nucleus during division with the two placentae, one still far from the other.

Fig. 23—Micronucleus during division and situated between the two placentae.

Fig. 24—Micronucleus during division, more enlarged, showing the two plates resulting from the division of the equatorial plate and in course of migration towards the poles.

Fig. 25—Final division stage of the micronucleus.

Fig. 26—A form with two micronuclei resulting from the division represented in the preceding figs. and with two placentae in the beginning of being stretched.

PLATE LIV

Fig. 27—Stretched placentae placed one near the other and the micronuclei at the opposite poles.

Fig. 28—Stretched placentae in course of migration, the micronuclei being near the placental extremities.

Figs. 29 and 30—Two migration stages of the placentae; the first signs of the plasm division are seen in both.

PLATE LV

Fig. 31—The two placentae, after migration, are situated at the extremities of the ciliate, the latter presenting advanced plasm division.

Fig. 32—A form resulting from the division represented by the preceding figure, the macronucleus being stretched; near one of the extremities is seen the micronucleus.

Fig. 33—Nuclear apparatus of a form resembling that which is represented by the preceding figure.

Fig. 34—A form more advanced than the preceding forms showing the division of the micronucleus and the structure of the middle part of the macronucleus.

PLATE LVI

Fig. 35—Form similar to the preceding, though at a more advanced stage.

Figs 36, 37 and 38—Macronucleus in degeneration, two mitoses of the micronucleus (forms which shall originate 4 placentae).

Fig. 39—Form with 4 placentae and the macronucleus in degeneration.

Fig. 40—Four placentae in groups of two and one micronucleus during division.

PLATE LVII

Fig. 41—A form with 4 placentae, two to two, each group with a micronucleus being situated at the extremities of the ciliate, showing the beginning of the plasm division.

Fig. 42—A form similar to the preceding (stained by Feulgen's).

Fig. 43—A form resulting from the antecedent division with the two elongated placentae and the micronucleus during division.

Fig. 43a—More enlarged nuclear apparatus of the preceding form.

Fig. 44—A form with 8 placentae.

PLATE LVIII

Balantidium coli of pig.

Fig. 45—Neutral individual during division.

Fig. 46—A cyst (stained with trioxyferrihematein).

Fig. 47—A form with two placentae without micronucleus (stained with borax-carmin).

Fig. 48—A form with 2 placentae and micronucleus (stained with borax-carmin).

Balantidium coli of man.

Fig. 49—A form with 2 placentae (stained with borax-carmin).

All the drawings were made with camera lucida at the hight of the table. The figs. 4, 10, 11, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 47, and 49 enlarged on a scale of about 1.200 diameters; the fig. 24 enlarged on a scale of about 3.000 diameters and the others of 1.750 diameters.

All the figures not accompanied by any indication were drawn from preparations stained with the modified Heidenhain.

PLATE LIX

Fig. 1—Neutral form of *Balantidium aragaoi* showing the macronucleus rounded with the micronucleus at its side.

Fig. 2—Form of *Balantidium aragaoi* with two placentae and the micronucleus already formed.

Fig. 3—Form alike to that of fig. 2 with the micronucleus in division.

All the drawings were made with camera lucida at the height of the table (× 1750).

Microphotographs

PLATE LX

Fig. 1—Vegetative form of *Balantidium simile.*

Fig. 2—Form of division of *Balantidium simile.*

Fig. 3—Cyst of *Balantidium simile,* still with the unique macronucleus.

Fig. 4—Cyst of *Balantidium simile,* showing the spindle-shaped macronucleus (A microphotograph more enlarged than that of nº 3).

Fig. 5—Ripe cyst of *Balantidium simile,* showing 2 nuclei, resulting from the division of the macronucleus.

Fig. 6—Cyst of *Balantidium simile,* showing in *s. res.* the mass of reserve substance, and in *n* the nucleus (A microphotograph of the same enlargement as that of nº 4).

Fig. 7—Ripe cyst of *Balantidium coli* of swine. In *m* is shown the macronucleus, unique, ribbon-like and crossing the whole cyst.

PLATE LXI

Fig. 8—Form of division of *Balantidium coli* of swine.

Fig. 9—Progamic form of *Balantidium simile,* showing in *micro* the enlarged micronucleus, and in *macro* the macronucleus.

Fig. 10—Progamic form of *Balantidium simile,* showing in *micro* the spindle-shaped micronucleus, in course of division. Near the micronucleus there is the macronucleus.

Fig. 11—*Balantidium simile,* showing in *pl* the two already formed placentae, and in *macro* the already degenerated macronucleus, of a roundish shape and intensely black stained. (A microphotograph of but a small enlargement, in order to show the two placentae, which were situated in different planes).

Fig. 12—The same form of the microphotograph nº 11, but more enlarged, whereby one of the placentae is not seen, because outside of the focus. The microphotograph was taken, in order to show the structure, presented by the placenta in the begining of its growth; *m.* indicates the limit of the completely developped membrane, whereas the mass *c*, in which the stained chromatin is placed, as not being completely developped, does not yet fill the space limited by the membrane. In *macro*, there can be seen the degenerate macronucleus, of a roundish shape, intensely stained and much reduced in size.

Fig. 13—Form with two placentae (pl), where there are no more traces of the macronucleus; *e* shows the clear space existing between the membrane of the placenta and the central chromatic mass.

PLATE LXII

Fig. 14—Form with two placentae, already near each other. In this form it is not yet noted the presence of the micronucleus. In *m* is clearly seen the membrane, surrounding the placenta.

Fig. 15—Form in which the two placentae are situated near each other; between them is clearly seen the micronucleus *(micro)*.

Fig. 16—Form with the two placentae, already of ribbon-like shape, situated in parallel lines and ready to migrate towards the opposite extremities of the parasite.

PLATE LXIII

Figs. 18 and 19—Two forms with migrating placentae and with signs of plasm division.

Fig. 20—Form in which the two placentae are already situated at the opposite extremities of the parasite.

Figs. 21 and 22—Forms resulting from the earlier forms, showing the greatly stretched placentae.

PLATE LXIV

Figs. 23 and 24—Forms similar to those of 21 and 22, though at a more advanced stage, showing marks of plasm division.

Fig. 25—Form presenting a more advanced stage of division. In *b* there is seen the new cytostome already formed.

Fig. 26—Final form of division of the preceding forms. Macronucleus not yet reconstituted.

PLATE LXV

Fig. 27—Form with 4 placentae.

Fig. 28—Form with 4 placentae (pl) arranged two to two.

Fig. 29—Form with 3 placentae (pl).

Fig. 30—Form with two stretched placentae (pl) and with a unique micronucleus, resulting from the division of forms with 4 placentae.

Pesquizas helminthologicas realisadas em Hamburgo (*)

III. Trematodeos dos generos Pneumonoeces e Ostiolum

por

LAURO TRAVASSOS e **ANTONIO R. DARRIBA**

(Com as estampas LXVI—LXXI).

Os trematodeos do pulmão dos batrachios são constituidos por dois grupos: o primeiro pelo genero *Pneumonoeces*, mais tarde desdobrado e o segundo pelo genero *Haplometra*.

Vamos nos occupar do primeiro grupo nomeado.

O genero *Pneumonoeces* foi estabelecido por Looss em 1899, que o denominou de *Haematoleuchus*, nome occupado e por isso mudado em 1902, para *Pneumonoeces*. Quando Looss estabeleceu o genero incluio nelle apenas 3 especies denominadas *P. variegatus*, *P. similis* e *P. asper*. Estas tres especies tinham sido antes (1894) estudadas como sendo apenas uma, o que acarretou algumas confusões de auctores que posteriormente se occuparam com estes parasitos; assim Luehe reproduz com o nome de *P. variegatus* uma figura de Looss que este auctor diz corresponder ao *similis*, mas que nos parece dever corresponder talvez ao *asper*. Das especies europeas não mais se fez um estudo de revisão. Wundsch em 1911 em sua these de doutoramento caracterisou bem o *asper* e descreve, aliás de um modo menos recommendavel, pois limitou-se a fazer a diagnose differencial, uma nova especie a que denominou *Pneumonoeces schulzei*.

Deste modo as especies deste genero encontradas na Europa ficam sendo 4. Na America do Norte, Stafford descreveu as seguintes: *P. breviplexus*, *P. varioplexus*, *P. similiplexus*, *P. longiplexus*, e *P. medioplexus*. *Varioplexus* e *similiplexus* são consideradas identicas. As duas ultimas citadas foram separadas de *Pneumonoeces longiplexus* para constituir o typo do genero *Pneumobites* Ward, 1917 e *medioplexus* por ser identica a *Ostiolum formosum*, typo do genero *Ostiolum* Pratt, 1903.

O genero de Ward a nosso vêr não póde ser mantido.

Em 1905, Klein descreve uma especie da India, *P. campyristis*.

Em 1906 Seely descreve com o nome de *P. complexus* uma outra especie norte americana. Johnston (1912), descreve uma da Australia com o nome de *P. australis*. Cort, em 1917, descreve com o nome de *P. coloradensis* mais uma especie que deve ser incluida no genero *Ostiolum*. Travassos e Artigas descrevem em 1927 a primeira especie sul americana *P. neivai*. Lutz, em 1928 denominou de *P. pla-*

(*) Recebido para publicação á 15 de Fevereiro de 1930.

norbinus o parasito commum no pulmão das rãs do Rio de Janeiro e no mesmo trabalho dá uma figura de *P. neivai*, referida na explicação das figuras com o nome de *P. pseudis* sem qualquer outra referencia no texto. Finalmente Irwin em 1929, descreve mais uma nova especie norte americana *P. parviplexus*. Resumindo verificámos ser 17 o numero de especies mencionadas na bibliographia para o grupo *Pneumonoeces* e mais uma que descrevemos agora. Destas, algumas nos parecem synonymas, como veremos adiante.

São as seguintes as especies incluidas no genero *Pneumonoeces:*

variegatus (Zeder, 1800)
similis (Looss, 1899)
asper (Looss, 1899)
longiplexus (Stafford, 1902) *(Pneumobites)*
breviplexus (Stafford, 1902)
varioplexus (Stafford, 1902) (=*similiplexus)*
similiplexus (Stafford, 1902) (=*varioplexus)*
medioplexus (Stafford, 1902) (=*Ostiolum formosum)*
campyristis Klein, 1905
complexus Seely, 1906 *(Ostiolum)*
schulzei Wundsch, 1911
australis Johnston, 1912
coloradensis Cort, 1917 *(Ostiolum)*
neivai Travassos & Artigas, 1927
planorbinus Lutz, 1929 (n. n.) *(=neivai)*
pseudis Lutz, 1929 (só figura) (=*neivai*)
parviplexus Irwin, 1929
fuelleborni n. sp.

Fazendo um estudo comparativo cuidadoso entre estas diversas especies notamos logo dois typos fundamentaes—um caracterisado pela presença de duas alças uterinas longitudinaes, situadas na area extra-cecal e outro no qual estas alças extracecaes não existem. Esta conformação do utero é muito curiosa e a eschematisamos nas figuras 1 e 2. Estes dois typos uterinos caracterisam os generos *Pneumonoeces* e *Ostiolum*.

No grupo onde existe a alça extracecal a porção ascendente e descendente do utero formam alças transversaes muito largas e que geralmente ultrapassam os campos cecaes nos dois lados. Neste grupo observam-se variações enormes nas dimensões das alças longitudinaes e, baseando-se nisto, Ward propoz o genero *Pneumobites*, que como dissemos não deve ser mantido. Observamos os dois typos extremos de desenvolvimento da alça longitudinal nas duas especies: *longiplexus* e *fuelleborni*. Esta ultima especie pode ser interpretada a primeira vista como uma fórma intermediaria entre *Pneumonoeces* e *Ostiolum*. O exame mais attencioso, mostra, pelo aspecto geral do utero, que apenas houve uma reducção nas dimensões das alças sem haver a disposição que caracterisa *Ostiolum*.

Um outro orgão que apresenta typos estructuraes diversos são os vitellinos. Nos diversos *Pneumonoeces* observam-se dois typos de vitellinos—um observado em *variegatus* e no qual os folliculos são dispostos por grupos em fórma de «roseta» e se estendem de um modo mais ou menos symetrico na porção anterior e posterior do corpo, e outro typo em que que a disposição em roseta não é evidente, ficando os folliculos apenas na metade anterior do corpo, é o typo observado em *similis*. Pelo criterio de Witenberg este caracter seria sufficiente para um novo genero o que não parece razoavel.

Entre as diversas especies de *Pneumonoeces* destacam-se o *P. campyristis* pela reduzida bolsa do cirro, que em todas as outras é extremamente a longada. O acetabulo é tambem susceptivel de grandes variações, aliás é sempre mediocre; o maior tamanho relativo é encontrado em *schulzei* e em *neivai* falta completamente. O revestimento cuticular póde ser guarnecido de espinhos em

pequeno numero; em *variegatus, breviplexus, campyristis, australis, neivai* e *fuelleborni* faltam.

No genero *Ostiolum* tambem os espinhos faltam em uma especie-*complexus*.

A posição dos testiculos, invocada por Ward como um dos elementos genericos de *Pneumobites*, não nos parece razoavel pois podemos observar todas as modalidades, sendo que *neivai* póde apresentar os dois typos dependendo do gráo da contractura. Aliás *neivai* se approxima muito, pelas alças longitudinaes do utero, de *P. longiplexus*. Um factor importante para a caracterisação dos *Pneumonoeces* é o tamanho dos ovos. Foi este o caracter fundamental de Looss para separar as tres primeiras especies européas e é ainda este caracter que permitte bem separar *asper* de *schulzei*. De um modo geral os *Pneumonoeces* se pódem bem caracterisar pelos seguintes elementos: comprimento relativo da porção anterior do corpo (pré-acetabular), disposição dos vitellinos, comprimento relativo das alças longitudinaes do utero, relação entre as ventosas, dimensões dos ovos e pelos espinhos cuticulares.

A evolução ainda não foi descripta de um modo claro para nenhuma especie.

Pneumonoeces Looss, 1902.

Distomum auctor. p. p.
Haematoleuchus Looss, 1899, p. 600.
Haematoleuchus Luehe, 1900, p. 557 e 561.
Haematoleuchus Stiles, 1901, p. 189.
Haematoleuchus Stiles & Hassal, 1902, p. 20.
Haematoleuchus Stafford, 1902, p. 895.
Haematoleuchus Odhner, 1902, p. 45.
Haematoleuchus Pratt, 1902, p. 888.
Haematoleuchus Stafford, 1902, p. 418.
Haematoleuchus Stafford, 1902, p. 725.
Pneumonoeces Looss, 1902, p. 732.
Pneumonoeces Pratt, 1903, p. 37.
Pneumonoeces Klein, 1905, p. 64.
Haematoleuchus Klein, 1905, p. 64.
Pneumonoeces Stafford, 1905, p. 687.
Pneumonoeces Luehe, 1909, p. 90 e 102.
Pneumonoeces Wundsch, 1911, p. 5.
Pneumonoeces Cort, 1915, p. 212.
Pneumobites Ward, 1917, p. 5.
Pneumobites Ward, 1918, p. 403.
Pneumonoeces Ward, 1918, p. 403.
Pneumonoeces Travassos & Artigas, 1927, p. 214 (erro).
Pneumonoeces Fuhrmann, 1928, p. 112.

Diagnose: *Plagiorchidae: Saphedrinae.*—Trematodeos de tamanho médio, com cuticula lisa ou revestida de espinhos; acetabulo reduzido ou ausente; póro genital na zona do pharynge; bolsa do cirro muito longa com cirro, prostata e longa vesicula seminal; testiculos intracecaes, ellipsoides mais ou menos allongados, com zonas e campos geralmente coincidindo parcialmente; utero com o ramo descendente formando na extremidade posterior duas alças longitudinaes extra-cecaes mais ou menos longas; ovos de casca escura quasi negra; vitellinos com folliculos de dimensões médias, geralmente formando rosetas, dorsaes, extra e intra-cecaes.

Habitat: pulmão de anuros.

Especie typo: *P. variegatus* (Rudolphi, 1819).

Pneumonoeces variegatus (Rudolphi, 1819).

(Est. LXVI, figs. 3—4)

Distoma variegatum Rudolphi, 1819, p. 99 e 378, *p. p.*
Distoma (Brachylaimus) variegatus Dujardin, 1845, p. 416, p. p.
Distoma variegatum Pagent, 1857, p. 41, pl. 5, fig. 2, *p. p.*

Distoma variegatum Molin, 1859, p. 828, pl. 3, fig. 2, *p. p.*

Distoma variegatus Looss, 1892, p. 65, *p. p.*

Distoma variegatus Looss, 1893, p. 812, etc. fig. 3, *p. p.*

Distoma cylindraceum Pachinger, 1888, p. 105, etc. fig. B. C. pl. I, *p. p.* (segundo Looss).

Distomum variegatum Looss, 1894, p. 71, etc. pl. II, fig. 45, 46, 47 ?, 48, pl. VII, fig. 135, (pl. VII, fig. 135, (pl. VII, figs. 134, 136—146 ?); *p. p.*

Distoma variegatum Luehe, 1899, p. 533, *p. p.*

Haematoleuchus variegatus Looss, 1899, p. 601.

Haematoleuchus variegatus Luehe, 1900, p. 556.

Haematoleuchus variegatus Stiles, 1901, p. 178.

Distoma variegatum Stiles & Hassal, 1902, p. 20.

Distoma variegatum Gronkowski, 1902, p. 511, 518, 531, pl. 13, figs. 3, 11, 12.

Pneumonoeces variegatus Looss, 1902, p. 806.

Haematoleuchus variegatus Looss, 1902, p. 429.

Distomum variegatum Stafford, 1902, p. 895.

Haematoleuchus variegatus Stafford, 1902, p. 896.

Pneumonoeces variegatus Klein, 1905, p. 59, etc.

Haematoleuchus variegatus Ssinitzin, 1905, p. 137.

Haematoleuchus variegatus Ssinitzin, 1906, p. 686.

Distomum variegatum Ssinitzin, 1907, p. 34.

Pneumonoeces variegatus Luehe, 1909, p. 104 (não a figura 82).

Pneumonoeces variegatus Wundsch, 1911, p. 40.

Pneumonoeces variegatus Johnston, 1912, p. 286.

Distomum variegatum Cort, 1915, p. p. 203.

Distomum variegatus Nicoll, 1926, p. 15.

Pneumonoeces variegatus Fuhrmann, 1928, p. 68, fig. 89.

Esta especie é a mais caracteristica por apresentar a porção do corpo pré-acetabular muito alongada. E' a maior especie do genero. Corpo alongado, claviforme, sendo a porção pré-acetabular muito mais delgada que a posterior. A cuticula é lisa e o acetabulo bem desenvolvido e mais ou menos equatorial ou logo adiante do meio do corpo, é menor que a ventosa oral. Ventosa oral sub-terminal, seguida logo pelo pharynge que é forte. Esophago curto e delgado. Cecos estendendo-se até perto da extremidade posterior, são largos e pouco sinuosos. Póro genital na zona pharyngeana. Bolsa do cirro delgada e extremamente longa, sem comtudo attingir o acetabulo; contêm cirro, prostata e longa e sinuosa vesicula seminal. Os testiculos são ellipsoides alongados, post-equatoriaes, com zonas e campos coincidindo mais ou menos, conforme o estado de contractura do corpo. Ovario igualmente ellipsoide alongado, podendo apresentar algumas vezes lobulações pouco profundas; anteriormente attinge a zona acetabular e posteriormente a zona do testiculo anterior; é situado lateralmente. Espermatheca muito desenvolvida, tão grande como o ovario, é situada medianamente na zona ovariana e com area coincidindo parcialmente. Glandula de Mehlis muito desenvolvida. Utero constituido por um ramo descendente que fórma alças transversaes mais ou menos amplas até attingir a extremidade posterior do corpo, mantendo-se sempre na area intra cecal; após attingir a extremidade posterior fórma duas grandes alças longitudinaes extra-

cecaes, a direita e a esquerda do corpo, estas alças são muito desenvolvidas e attingem a zona ovariana, isto é, mais ou menos o equador do corpo. Após a formação das alças o utero se dirige para deante, pela area intra-cecal, formando sinuosidades e pequenas alças para terminar, por uma vagina pouco desenvolvida, no póro genital. Os ovos contidos no utero são de côr castanho escura tornando-se quasi negros na porção terminal; são operculados e apresentam ainda no utero embrião formado. Os vitellinos são dispostos por grupos de folliculos formando rosetas dispostas dorsalmente na area cecal, intra e extra-cecal, desde logo abaixo da bifurcação do apparelho digestivo até perto da terminação dos cecos, em regra ultrapassando a zona testicular. Dos diversos exemplares medidos organisamos o seguinte quadro de dimensões:

Comprimento	8,56 mm	7,18	7,75	7,06	8,50	11,50
Largura	1,37	1,25	1,43	1,31	1,37	2,18
Acetabulo	0,52 × 0,44	0,27×0,22	0.28×0,28	0,19×0,17	0,31×0,31	0,34×0,34
Ventosa oral	0,47 × 0,44	0,42×0,41	0,41×0,42	0,40×0,40	0,45×0,42	0,47×0,47
Pharynge	0,21 × 0,22	0,17×0,17	0,17×0,21	0,18×0,20	0,21×0,21	0,21×0,21
Testiculos	1, × 0,57	0,92×0,45	1,1×0,42	0,8×0,5	1,×0,6	1,1×0,4
	1,2 × 0,50	1,×0,50	1,1×0,55	1,×0,5	1,1×0,6	1,5×0,4
Ovario	0,61 × 0,37	0,74×0,28	0,80×0,35	0,71×0,24	0,85×0,35	0,95×0,35
Ovos	0,024–0,028 × 0,016	0,028 × 0,016	0,024 × 0,016	0,028 × 0,016	0,024–0,026 × 0,016	0,028 a 0,032 × 0,020

Habitat: pulmão de *Rana temporaria* L., *R. esculenta* L. e *Colopteryx virgo*.

Destribuição geographica: Europa.

Examinámos desta especie material proveniente de Hamburgo, por nós colleccionado, que nos foi dado pelo Dr. Hoeppli e que existia no Museu Zoologico de Hamburgo. Examinámos tambem material de *Rana esculenta ridibunda* Pall., colleccionado no Turquestão Russo pelo Dr. M. Strom. Entre os exemplares examinados tivemos a opportunidade de observar um (fig. 4) que apresentava anomalia das glandulas genitaes representada por um desdobramento dos testiculos e do ovario. O testiculo anterior tinha a porção separada em um pequeno corpo redondo e o testiculo posterior era duplo; media o testiculo anterior 1,14 × 0,42 mm. e corpusculo anterior 0,28 × 0,25 mm., os testiculos posteriores mediam respectivamente 1,17 × 0,55 e 0,51 × 0,35 mm. O ovario era duplo existindo além do normal um outro menor separado do primeiro pela area da espermatheca; mediam respectivamente 0,80 × 0,35 e 0,32 × 0,18 mm. Anomalia do testiculo semelhante a esta já foi referida por Clemente Pereira (1929), a proposito de uma especie do genero *Opisthogonimus*.

Desta especie não existe uma bôa descripção na litteratura, visto ser a de Looss baseada em tres especies diversas pelo menos. Existem porém bons desenhos devidos a Looss e a Fuhrmann. Relativamente a evolução supponho existir confusão entre as diversas especies sendo util, agora que é moda o estudo dos cyclos evolutivos, que se faça uma revisão do cyclo das diversas especies européas. No estudo da evolução dos trematodeos

deve-se abandonar a technica geralmente seguida de procurar as Cercarias ao acaso e com estas se tentar obter o adulto. Para que os cyclos sejam verificados sem riscos de confusão se deverá partir dos adultos e infestar molluscos reconhecidamente não parasitados. Este proceder além de menos empirico é realmente mais facil, dado o numero limitado de especies de molluscos relativamente ao numero de especies de trematodeos e de hospedeiros definitivos.

Trabalhamos no seguinte material, além dos exemplares do Museu Zoologico de Hamburgo, que foram restituidos aquelle modelar Instituto:

Nº. 6.397—6.404 provenientes do Turquetão Russo colleccionado por Strom, de *Rana esculenta ridibunda* Pall.

Nº. 6.405 proveniente Saratow-Wolga, colleccionado por Strom, de *Rana escul. ridibunda* Pall.

Nº. 6.406—6.409 proveniente de Hamburgo e por nós colleccionado, em *Rana esculenta* L.

Nº. 6.501 proveniente de Hamburgo e por nós colleccionado, em *Rana esculenta* L.

Pneumonoeces similis (Looss, 1899).

(Est. LXVI, figs. 5—8).

Distomum variegatum auct. p. p.

Distomum variegatum Looss, 1894, p. p. pag. 71 (pl. II, fig. 43 ?).

Haematoleuchus similis Looss, 1899, p. 601.

Distoma similis Looss, 1899, p. 602, nec Sonsino, 1896.

Haematoleuchus similis Stiles, 1902, p. 178.

Haematoleuchus similis Stiles & Hassall, 1902, p. 20.

Haematoleuchus similigenus Stiles & Hassall, 1902, p. 20.

Pneumonoeces similis Klein, 1905, p. 61.

Pneumonoeces similis Luehe, 1909, p. 104 (não figura 82).

Pneumonoeces similis Wundsch, 1911, p. 40.

Pneumonoeces similigenus Cort, 1915, p. 203.

Pneumonoeces similis Cort, 1915, p. 203.

Pneumonoeces similigenus Nicoll. 1926, p. 15.

Corpo alongado sub-cylindrico. Cuticula guarnecida de pequenos espinhos. Acetabulo menor que a ventosa oral, pré-equatorial. Ventosa oral sub-terminal. Pharynge logo em seguida á ventosa; esophago curto e largo; cecos estendendo-se até perto da extremidade posterior do corpo. Póro genital na area do pharynge, sub-mediano. Bolsa do cirro muito longa e delgada, attinge a zona acetabular; contem cirro, prostata e longa vesicula seminal sinuosa. Testiculos redondos com zonas geralmente afastadas e campos coincidindo parcialmente, post-equatoriaes. Ovario redondo com zona e campo abrangendo a zona e campo acetabulares. Espermatheca post-ovariana, maior que o ovario. Utero constituido por um ramo descendente com ovos de casca ainda de côr clara; este ramo fórma varias alças entre os testiculos e que ultrapassam a area cecal e dirige-se depois para traz, onde fórma de cada lado do corpo uma grande alça longitudinal extra-cecal, com um comprimento approximadamente igual a quarta parte do comprimento total do corpo e attingindo apenas a parte media da zona do testiculo posterior. O ramo ascendente do utero fórma alças que attingem e ultrapassam as areas cecaes antes de attingir a zona acetabular, depois da zona acetabular fica inteiramente intra-cecal. Ovos na ultima porção do utero de côr castanho escura, quasi negra, operculados. Vitellinos constituidos por volumosos folliculos situados na parte

mediana do corpo; acima do acetabulo os folliculos vitellinicos invadem a area intra cecal, abaixo da zona cetabular se mantem na area extra-cecal; anteriormente ficam muito abaixo da bifurcação intestinal e posteriormente terminam na zona do testiculo anterior. As dimensões desta especie são as seguintes:

Comprimento	9,4	4,6	4,7	8,3
Largura	1,3	1	1,3	1,6
Acetabulo	0,31×0,31	0,24×0,28	0,30×0,30	0,35×0,36
Ventosa oral	0,50×0,45	0,35×0,40	0,41×0,42	0,42×0,42
Pharynge	0,17×0,20	0,14×0,18	0,17×0,20	0,17×0,20
Testiculos	0,57×0,57 0,50×0,71	0,30×0,45 0,60×0,50	——— ———	0,71×0,85 0,78×1,1
Ovario	0,50×0,54	0,35×0,35	———	0,60×0,50
Ovos	0,036×0,026	0,032—0,040 × 0,016—0,020	0,032—0,036 × 0,016	0,032—0,40 × 0,018—0,024

A espermatheca póde ser do tamanho ou maior que o ovario.

Habitat: pulmão de *Rana temporaria* L., *R. esculenta* L.

Destribuição geographica: Europa.

Esta especie se distingue facilmente de todas as outras especies pela disposição dos vitellinos.

Looss em 1899 diz que a sua figura 43 (1894) corresponde a esta especie, o que nos parece muito duvidoso pela disposição das alças longitudinaes do útero e ainda pela posição dos testiculos. Temos a impressão que a figura de Looss corresponde ao *asper* no qual não tenha sido representado o vitellino posterior. Esta mesma figura foi reproduzida por Luehe como sendo do *P. variegatus.*

Desta especie trabalhamos no seguinte material, além dos exemplares do Museu Zoologico de Hamburgo:

6.410-6,412. *Rana esculenta ridibunda* Pall. Saratow-Wolga, col. por M. Strom.

6.412-6417. *Rana esculenta* L. Hamburgo, col. por Travassos.

6.502. *Rana esculenta* L. Hamburgo, col. por Travassos.

Pneumonoeces asper (Looss, 1899).

(Est. LXVI, figs. 9—11; est. LXVII, fig. 12).

Distomum variegatum auct. p. p.

Distomum variegatum Looss, 1894, p. 71, etc., *p. p.* (fig. 43, pl. II ?).

Haematoleuchus asper Looss, 1899, p. 601.

Haematoleuchus asper Luehe, 1902, p. 238.

Haematoleuchus asper Stafford, 1902, p. 896.

Pneumonoeces asper Klein, 1905, p. 64.

Pneumonoeces asper Luehe, 1909, p. 104.

Pneumonoeces asper Wundsch, 1911, p. 8, 40.

Haematoleuchus asper Cort, 1915, p. 203.

Pneumonoeces asper Nicoll, 1926, p. 15.

Corpo achatado, de contorno ellipsoide, tendo o polo anterior mais attenuado. Cuticula revestida de pequenos espinhos curtos que lhes empresta aspecto aspero. Acetabulo forte, pré-equatorial e pouco

menor que a ventosa oral. Ventosa ooral sub-terminal, seguida logo do pharynge que é forte. Esophago curto. Cecos longos e sinuosos, terminando perto da extremidade posterior do corpo. Póro genital na zona do pharynge. Bolsa do cirro longa e com muitas sinuosidades, attinge a zona do acetabulo. Testiculos arredondados, situados na parte média do corpo, com campos e zonas coincidindo parcialmente. Ovario pré-acetabular, lateral, em geral parcialmente na zona e campo acetabulares. Espermatheca geralmente mais volumosa que o ovario, post-acetabular. Utero, com ramo descendente contendo ovos de casca castanho claro, intra-cecal, na parte posterior fórma duas alças longitudinaes lateraes, extra-cecaes que attingem, e ás vezes ultrapassam, a zona do testiculo posterior. O ramo ascendente do utero contém ovos de casca escura e quasi negra, dirige-se para diante na area intra-cecal formando alças mais ou menos grandes. Acima do acetabulo torna-se mais estreito e fórma um grupo de alças enoveladas. Os vitellinos são constituidos por folliculos volumosos, não formando rosetas typicas; um anterior, localizado na metade anterior do corpo de modo a formar um semicirculo cuja parte central é intra-cecal e as extremidades cecaes; a outra glandula é situada na metade posterior do corpo, geralmente intra-cecal, raramente invadindo a area extra-cecal. São as seguintes as dimensões desta especie:

Comprimento	5,2	5,1	4,0
Largura	1,4	1,6	1,3
Acetabulo	0,34 × 0,32	0,32 × 0,32	0,24 × 0,32
Ventosa oral	0,38 × 0,38	0,34 × 0,44	0,28 × 0,31
Pharynge	0,14 × 0,17	0,14 × 0,17	0,12 × 0,12
Testiculos	0,85 × 0,64	0,85 × 0,68	0260 × 0,57
	——	1,1 × 0,61	——
Ovario	0,57 × 0,42	0,42 × 0,31	0,44 × 0,48
Ovos	0,056 × 0,028—0,032	0,056—0,064 × 0,24—0,026	0,054—0,056 × 0,028—0,032

Habitat: pulmão de *Rana esculenta* L., *R. esculenta ridibunda* Pall.

Distribuição geographica: Europa.

Esta especie, creada por Looss como especie dubia, foi bem estudada por Wundsch que fez um detalhado estudo comparativo com o *similis*.

Desta especie trabalhamos no seguinte material, além de alguns exemplares do Museu Zoologico de Hamburgo:

6.418-6.428. *Rana esculentaa* L. proveniente de Hamburgo colleccionados por Travassos.

6.427. *Rana esculenta ridibunda* Pall. Saratow-Wolga col. por Strom.

6.502-6.505. *Rana esculenta*, Hamburgo, colleccionado por Travassos.

Pneumonoeces longiplexus (Stafford, 1902).

(Est. LXVII, figs. 13—14).

Haematoleuchus longiplexus Stafford, 1902, p. 901, pl. 33, fig. 1.

Pneumonoeces longiplexus Stafford, 1905, p. 687.

Pneumonoeces longiplexus Klein, 1905, p. 64.

Pneumonoeces longiplexus Seely, 1906, p. 249.

Pneumonoeces longiplexus Cort, 1915, p. 212, fig. 1E, 4A, 10, 12, 14.

Pneumobites longiplexus Ward, 1917, p. 5.

Pneumobites longiplexus Ward, 1918, p. 403, fig. 700.

Pneumonoeces longiplexus Irwin, 1929, p. 74.

Desta especie, estudada por Stafford e Cort, resumiremos no quadro abaixo as principaes caracteristicas.

	STAFFORD	CORT
Comprimento	7 a 8 mm. podendo attingir até 15 mm.	2,6 mm.
Largura	2 podendo attingir 3 mm.	2 mm.
Cuticula	Sem espinhos.	Com espinhos.
Acetabulo	———	0,17 mm.
Relação entre o acetabulo e a ventosa oral	———	2:1 a 5:3
Ventosa oral	0,46—0,7 mm.	2 vezes maior que o acetabulo; 0,36 × 7,46 mm.
Pharynge	———	0,22 × 0,18 mm.
Testiculos	Alongados e symetricos.	Alongados e irregulares.
Ovario	Ao nivel do acetabulo.	Lobado, oblongo.
Utero	Com alças longitudinaes attingindo quasi a ventosa oral.	Com alças longitudinaes attingindo o pharynge.
Vitellinos	Em toda a extensão do corpo, em roseta.	Com 16 a 26 folliculos em cada roseta. Em toda a extensão do corpo desde logo abaixo do pharynge até perto da extremidade posterior.
Ovos	Com 0,022 × 0,017.	0,022 a 0,027 × 0,014 a 0,017.

Destribuição geographica: America do Norte.

Comparando as descripções e figuras destes auctores notamos como unica differença apreciavel a presença de espinhos notada por Cort e que não foram vistos por Stafford.

Como já fizemos notar, não nos parece razoavel a separação desta especie em genero a parte.

Pneumonoeces breviplexus (Stafford, 1902).

(Est. LXVII, figs. 15—16).

Haematoleuchus breviplexus Stafford, 1902, p. 904, pl. 33, fig. 2.

Pneumonoeces breviplexus Stafford, 1905, p. 687.

Pneumonoeces breviplexus Klein, 1905, p. 61.

Pneumonoeces breviplexus Cort, 1915, p. 216, fig. 1F, 9.

Pneumonoeces breviplexus Ward, 1918, p. 403.

Pneumonoeces breviplexus Irwin, 1929, p. 75.

Esta especie foi estudada por Stafford e Cort de cujas descripções fazemos o resumo abaixo.

	STAFFORD	CORT
Comprimento	12 a 18 mm.	5,8 a 9,4 mm.
Largura	2 a 2,5 mm.	1,3 a 2,7.
Cuticula	Com espinhos dirigidos para traz.	Lisa
Acetabulo	0,12 × 0,16 mm.	Com metade da ventosa oral.
Ventosa oral	Com o dobro do acetabulo.	0,28 mm.
Pharynge	———	0,14 mm.
Testiculos	Obliquos, lobados e alongados.	Obliquos, lobados e alongados.
Ovario	Lobado; post-acetabular.	Profundamente lobado.
Utero	Alças longitudinaes não ultrapassando a zona do testiculo posterior.	Alças logitudinaes attingindo a zona do testiculo posterior.
Vitellinos	Em rosetas de 8 a 15 elementos.	Em rosetas de 12 a 20 elementos.
Ovos	0,022 × 0,17 mm.	0,020 a 0,026 × 0,013 a 0,016 mm.
Habitat	*Rana catesbiana, R. virescens*	*Rana catesbiana, R. clamitans, Bufo americanus*

Destribuição geographica: America do Norte.

Entre as descripções de Stafford e Cort ha a notavel differença da ausencia de espinhos cuticulares provavelmente devidas a um equivoco de Stafford. O ovario tambem apresenta differenças na lobulação, assim como as alças longitudinaes do utero que vão muito mais adiante nos exemplares de Cort. Não obstante essas differenças nos parece fóra de duvidas a identidade das especies.

Pneumonoeces varioplexus (Stafford, 1902).

(Est. LXVII, figs. 17—20).

Haematoleuchus varioplexus Stafford, 1902, p. 907, fig. 3.

Haematoleuchus similiplexus Stafford, 1902, p. 907, fig. 4.

Pneumonoeces varioplexus Stafford, 1905, p. 687.

Pneumonoeces similiplexus Stafford, 1905, p. 687.

Pneumonoeces varioplexus Klein, 1905, p. 61.

Pneumonoeces similiplexus Klein, 1905, p. 64.

Pneumonoeces similiplexus Seely, 1906, p. 252.

Pneumonoeces varioplexus Cort, 1915, p. 204.

Pneumonoeces similiplexus Cort, 1915, p. 219, fig. 1A, 3, 4B.

Esta especie foi descripta por Stafford como sendo duas, julgando Cort dever considerar como uma. Acceitamos o criterio deste ultimo. Resumimos aqui os caracteres mencionados por Stafford para os seus *P. similiplexus* e *varioplexus* e os de Cort.

Consideramos como tendo prioridade a denominação de *varioplexus*, por ter sido debaixo deste nome que primeiro foi descripta no trabalho de Stafford. Reproduzimos tambem as duas figuras de Stafford e a de Cort.

Distribuição geographica: Ameriea do Norte.

A não ser as dimensões das alças uterinas longitudinaes, que na descripção de Cort attingem a zona do testiculo anterior, tudo o mais concorda de modo evidente.

	STAFFORD	CORT
Comprimento	3 a 8 mm. e 9 mm.	5,8 mm.
Largura	2 mm.	1,9 mm.
Cuticula	Com espinhos.	Com espinhos na porção anterior, adiante dos testiculos.
Acetabulo	Grande, pre-equatorial, com 0,38 e 0,41 mm.	Na relação de 3:4 para a ventosa anterfor.
Ventosa oral	0,44 × 0,41 mm. e 0,57 × 0,51 mm.	Na relação de 4:3 para o acetabulo.
Pharynge	———	Na relação de 1:2 com a ventosa oral.
Testiculos	Pequenos, redondos, em geral regulando o ovario	Sem lobos, redondos ou ovaes.
Ovario	Redondo, abaixo do acetabulo.	Sem lobos, redondo ou oval.
Utero	Com alças longitudinaes attingindo a zona do testiculo posterior.	Com alças longitudinaes attingindo a zona do testiculo anterior.
Vitellinos	Com rosetas.	Com rosetas de 6 a 13 foliculos e dispostas desde logo abaixo do esophago até a extremidade posterior.
Ovos	Com 0,039 × 0,019.	0,034 a 0,040 × 0,017 a 0,021 mm.
Habitat	*Rana virescens, Bufo lentigiosus.*	*Rana pipiens, Bufo americanus.*

Pneumonoeces schulzei Wundsch, 1911.

(Est. LXVIII, fig. 21).

Pneumonoeces schulzei Wundsch, 1911, p. 38, 41.

Desta especie não existem descripção detalhada nem figuras. Limitou-se Wundsch apenas a salientar as differenças entre ella e as outras especies. No material do Museu Zoologico de Hamburgo encontramos um exemplar de *Pneumonoeces* que julgamos corresponder a especie de Wundsch. Infelizmente este exemplar não estava bem conservado, além de estar muito retrahido. Deste exemplar damos a descripção que segue e um desenho.

Corpo ellipsoide, tendo o polo anterior mais attenuado; mede 4,6 mm. de comprimento por 1,7 mm. de largura maxima. Cuticula revestida de espinhos pequenos. Acetabulo forte, tão grande como a ventosa oral, mede 0,35 mm. de diametro. Ventosa oral sub-terminal com cerca de 0,25 mm. de diametro longitudinal por 0,41 mm. de diametro transversal.

Pharynge logo em seguida á ventosa oral, mede 0,14 de diametro longitudinal por 0,18 mm. de diametro transversal. Cecos longos e amplos, vão até perto da extremidade posterior do corpo. Póro genital ao nivel, do pharynge. Bolsa do cirro longa e sinuosa, attinge a zona acetabular. Testiculos ellipsoides, alongados no sentido do eixo longitudinal do corpo, com zonas coincidindo quasi inteiramente e campos apenas em contacto, medem respectivamente 1,21 × 0,85 e 1,21 × 0,78 mm. Ovario pré-equatorial, lateral, com a area coincidindo parcialmente com a area acetabular, mede cerca de 0,62 por 0,35 mm. de diametro. Espermatheca na zona do ovario. Utero com ramo descendente formando alças na area intra-cecal e na parte posterior formando alças longitudinaes extra-cecaes que attingem e ultrapassam as zonas testiculares. Estas alças são irregulares e formam muitas sinosidades. Porção ascendente do utero na area intra cecal; na zona acetabular e acima o utero fórma alças apertadas e enoveladas que algu-

mas vezes ultrapassam a area cecal. Ovos de casca escura quasi negra, como nas outras especies, medem cerca de 0,032 a 0,035 por 0,016 a 0,018 mm.

Vitellinos constituidos por acnes formando rosetas; um anterior e outro posterior formando semicirculos de concavidades voltadas para o meio do corpo; a parte central dos semicirculos dos vitellinos é situada na area intra-cecal e os extremos ficam na area cecal e extra-cecal.

Habitat: pulmão de *Rana* sp.

Distribuição geographica: Europa.

E' a seguinte a diagnose de Wundsch:

P. schulzei—Pelle com espinhos. Corpo regularmente oblongo, com 15 a 18 mm. de comprimento. Ramos da vesicula excretora ultrapassando claramente o acetabulo. Ventosas relativamente grandes. Ovario redondo. Testiculos ovaes e com margens regulares. Vitellinos attingindo a parte posterior do corpo e com grupos de folliculos formando rosetas typicas. Ovos com 0,025 a 0,027 por 0,019 mm. Esta diagnose se afasta da nossa descripção pelo tamanho do parasito, mas o exemplar que examinamos estava muito contrahido, aliás os trematodeos são susceptiveis de grandes variações no seu tamanho.

Esta especie se approxima bastante, pela anatomia geral, do *P. asper*, deste porém se distingue facilmente pelas dimensões dos ovos e pela disposição dos folliculos vitellinicos em rosetas typicas. Pelas dimensões dos ovos se approxima do *P. similis* do qual se distingue logo pelos vitellinos e pelas dimensões relativas das ventosas.

Pneumonoeces campyristis Klein, 1905.

(Est. LXVIII, fig. 22).

Pneumonoeces campyristis Klein, 1905, p. 60, pl. 5, figs. 1-2.

Pneumonoeces campyristis Johnston, 1912, p. 325.

Pneumonoeces campyristis Cort, 1915, p. 205.

Resumimos aqui a descripção de Klein para esta especie.

Comprimento 6 mm.; largura 1,4 mm.; cuticula sem espinhos; acetabulo com 0,15 mm.; ventosa oral com 0,32 mm.; pharynge com 0,18 mm.; bolsa do cirro curta, não attingindo o acetabulo, mede 0,84 mm. de comprimento por 0,24 mm. de largura; testiculos alongados, com campos e zonas coincidindo parcialmente; ovario na zona acetabular; utero com alças longitudinaes não ultrapassando as zonas testiculares; ovos com 0,028 a 0,030 por 0,014 a 0,018 mm.; vitellinos, com rosetas atypicas em numero de 6 a 8 e constituidas por 4 a 8 folliculos, um na porção anterior e outro na porção posterior do corpo, na area intra e extra-cecal.

Habitat: pulmão de *Rana exadactyla* Less.

Distribuição geographica: India.

Pneumonoeces australis Johnston, 1912.

(Est. LXVIII, fig. 23).

Pneumonoeces australis Johnston, 1912, p. 296, 320, fig. 11, 56-62.

Pneumonoeces australis Cort, 1915, p. 205.

Damos o resumo da descripção de Johnston.

Corpo em fórma de lingua; comprimento 3,5 a 4,9 mm.; largura 1,5 mm.; cuticula lisa, sem espinhos; acetabulo com 0,19 mm., na proporção de 1:2 com a ventosa oral; ventosa oral com 0,39 mm.; pharynge do tamanho do acetabulo; bolsa do cirro muito longa e tubular, attingindo o ovario; testiculos quasi na mesma zona; ovario na zona acetabular, lobado; utero com alças longitudinaes ultrapassando as zonas testiculares; ovos com 0,020 por 0,014 mm.; vitellinos formando um grupo anterior e outro pos-

terior de typicas rosetas de 12 a 15 folliculos, na area extra-cecal e intra-cecal.

Habitat: pulmão de *Hyla aurea* e *Limnodynaster peroni*.

Distribuição geographica: Australia.

Pneumonoeces neivai Travassos & Artigas, 1927.

(Est. LXVIII, figs. 24—25; est. LXIX, fig. 26; est. LXX, figs. 27—28).

Pneumonoeces neivai Travassos & Artigas, 1927, p. 212, fig. I.
Pneumonoeces planorbinus Lutz, 1928, p. 108.
Pneumonoeces pseudis Lutz, 1928, p. 133, fig. 3, est. 25.

Corpo de fórma oblonga, com um comprimento que varia de 3 a 7 mm. por uma largura maxima de 1,3 a 2,5 mm. Cuticula lisa. Acetabulo ausente, não tendo sido observados mesmo em córtes histologicos. Ventosa oral sub-terminal, medindo de 0,32 a 0,55 mm. de diametro. Pharynge em seguida á ventosa oral, espherico e medindo 0,12 a 0,25 mm. de diametro. Esophago muito curto. Cecos amplos, geralmente repletos de sangue (fig. 27) e se estendendo até perto da extremidade posterior do corpo e em grande parte occultos pelas alças uterinas. Póro genital junto á ventosa oral, mediano. Bolsa do cirro muito longa e sinuosa, geralmente muito difficil de observar em preparados totaes; attinge a zona ovariana; contém uma longa vesicula seminal sinuosa (fig. 26). Testiculos equatoriaes ou post-equatoriaes, com zonas coincidindo quasi inteiramente e campos em contacto, são alongados no sentido longitudinal e apresentam fraca lobulação; medem cerca de 0,72 a 1,2 mm. de comprimento por 0,4 a 0,8 mm. de largura maxima. Ovario redondo, mediano, pre-equatorial, mede cerca de 0,30 a 0,55 mm. de diametro. Glandula de Mehlis muito desenvolvida, situada entre o ovario e os testiculos e de contornos pouco nitidos. Espermatheca muito grande, entre o ovario e os testiculos. Utero com um ramo descendente sinuoso e passando entre os testiculos; alças longitudinaes extra-cecaes muito desenvolvidas, ultrapassando a zona ovariana; ramo ascendente do utero formando numerosas alças sobretudo acima da zona ovariana. Ovos de casca castanha escura, de operculo pouco nitido, medem de 0,053 a 0,061 mm. de comprimento por 0.030 mm. de maior largura. Vitellinos de folliculos volumosos e não formando rosetas typicas; um situado anteriormente na area intra e extra-cecal e outro situado posteriormente na area intra-cecal.

Habitat: pulmão de *Leptodactylus ocellatus* L. Lutz refere o seu *P. pseudis*, ao que parece, ao *Pseudis paradoxa* (L.) da Venezuela.

Distribuição geographica: Rio de Janeiro, S. Paulo-Brasil e Venezuella.

O *P. neivai* se localisa no pulmão destruindo largamente o parenchyma e algumas vezes reduzindo-o a ponto de tornal-o uma fina membrana constituida pela pleura visceral (figs. 27 e 28). Ficam sempre com a extremidade anterior dirigida para a pleura e com a ventosa oral commumente em contacto com ella. Sua nutrição é em grande parte feita de sangue que póde ser observado enchendo inteiramente os cecos onde os globulos vermelhos são completamente nitidos, sobretudo na porção mais anterior onde são menos dirigidos (fig. 27).

Sobre a evolução deste parasito Lutz diz a proposito de seu *P. planorbinus* a pagina 107: «Puse en claro la biologia de esta especie cuyas partenitas viven en varias especies grandes de *Planorbis*. Los sporocystos son pequenos e redondeados e las cercarias no tienen muchos distintivos, a no ser un grupo de glandulas cefalicas de cada lado do acetabulo. Estas larvas penetran en *Agrionidae*». Diz ter obtido fórmas jovens com cercaria de *Limnaea* que admitte sejam de *Haplome-*

tra palmipedis Lutz, 1928 *(=Glypthelmins)* ou de *Pneumonoeces*. E' interessante que as cercarias attribuidas a esta especie por Lutz apresentem acetabulo, orgão que falta no adulto, aliás se póde conservar rudimentar.

Pneumonoeces parviplexus Irwin, 1929.

(Est. LXIX, fig. 29).

Pneumonoeces parviplexus Irwin, 1929, p. 74, fig. 1, pl. 12.

E' o seguinte o resumo da descripção desta especie:

Comprimento 3,9 a 8,4 mm. Largura 0,85 a 1,6 mm. Cuticula inteiramente revestida de espinhos. Acetabulo na proporção de 1:4 relativamente á ventosa oral, na proporção de 4:1 para o acetabulo e 3:1 para o pharynge. Testiculos alongados e situados obliquamente. Ovario lobado, na zona acetabular. Utero com alças longitudinaes ultrapassando a zona do testiculo posterior. Ovos com 0,023 a 0,029 por 0,015 a 0,019 mm. Vitellinos formando cerca de 31 rosetas de 20 a 40 folliculos.

Habitat: pulmão de *Rana clamitans*.

Distribuição geographica: Norte America.

Pneumonoeces fuelleborni n. sp.

(Est. LXXI, fig. 30).

Desta especie apenas obtivemos um exemplar, mas é tão caracteristica que permitte uma bôa definição.

Comprimento 10 mm.; largura 2,3 mm. Cuticula lisa. Corpo claviforme com a maior largura post-equatorial. Acetabulo bem desenvolvido, equatorial, mede 0,31 mm. de diametro longitudinal por 0,37 mm. de diametro transversal. Ventosa oral sub-terminal, grande, mede 0,67 mm. de diametro. Pharynge logo em seguida á ventosa oral, forte, mede 0,30 mm. de diametro. Esophago relativamente curto. Cecos longos e pouco largos, estendem-se até a extremidade posterior do corpo. Póro genital na zona do pharynge; bolsa do cirro muito longa e sinuosa contendo um cirro nitido, prostata e longa vesicula seminal, estende-se até muito perto do acetabulo, isto é, até perto do meio do corpo. Testiculos alongados no sentido longitudinal, relativamente pequenos, post-equatoriaes, com zonas e campos em contacto; medem os testiculos respectivamente 0,57 e 0,71 mm. de comprimento por 0,57 e 0,42 mm. de largura. Ovario alongado longitudinalmente, lateral, parcialmente na zona acetabular, mede 0,81 por 0,50 mm. Espermatheca grande, mediana, parcialmente na zona do ovario, entre este e o testiculo anterior. Utero formando numerosas alças transversaes tanto na metade posterior como na metade anterior do corpo; o ramo descendente e o ascendente são completamente entrelaçados e difficeis de distinguir, as alças longitudinaes são muito reduzidas não attingindo nem a zona do testiculo posterior; o ramo ascendente fórma muitas alças transversaes que ultrapassam a area cecal. O conjuncto do utero lembra, quando observado com pequeno augmento, o typo observado no genero *Ostiolum*, mas não ha formação de grupos de alças transversaes descendentes e ascendentes como naquelle grupo. Vitellinos dispostos em dois grupos, um anterior e outro posterior, existindo porém muitos folliculos em todo o campo lateral mais ou menos occultos pelas alças do utero; anteriormente os vitellinos ficam muito abaixo da bifurcação intestinal intra e extra-cecaes; na parte média do corpo ficam sómente na area extra cecal e finalmente na parte posterior ficam em grande parte na area intra cecal, muito abaixo do testiculo posterior, mas acima da zona da terminação das alças longitudinaes do utero. Os ovos são como nas outras especies de côr escura quasi negra, operculados e medem de 0,032 a 0,039 mm. de comprimento por 0,016 a 0,021 mm. de maior largura.

Habitat: pulmão de *Bufo marinus* (L.).

Proveniencia: Estado de S. Paulo.

O unico exemplar desta especie que examinamos foi colleccionado, durante os trabalhos praticos do laboratorio de parasitologia da Faculdade de Medicina de S. Paulo, pelo estudante Nelson Planet.

Sobre as affinidades desta especie já nos referimos no principio do presente trabalho.

Ostiolum Pratt. 1902

Ostioloum Pratt, 1902, p. 888.
Ostiolum Pratt, 1903, p. 34.
Ostiolum Cort, 1915, p. 228.
Pneumonoeces Ward, 1918, p. 403, *p. p.*

Diagnose: *Plagiorchidae: Saphredinae.* Trematodeos de tamanho médio, de cuticula lisa ou com espinhos, de acetabulo reduzido; bolsa do cirro muito longa, com cirro, prostata e vesicula seminal; testiculos intracecaes, redondos, com zonas e campos em geral coincidindo parcialmente; utero com ramo descendente formando alças transversaes regulares, intra cecaes e nunca formando alçás longitudinaes; ovos de casca escura quasi negra; vitellinos com folliculos de dimensões médias, quasi inteiramente extra-cecaes e na parte média do corpo, formando rosetas.

Habitat: pulmão de anuros.

Especie typo: *O. medioplexus* (Stafford, 1902).

Ostiolum medioplexus (Stafford, 1902).

(Est. LXXI, figs. 31—33).

Haematoleuchus medioplexus Stafford, 1902, p. 908, pl. 33, fig. 5.
Ostiolum formosum Pratt, 1903, p. 34, pl. IV, figs. 6-8.
Pneumonoeces medioplexus Stafford, 1905, p. 687.
Ostiolum formosum Stafford, 1905, p. 687.
Pneumonoeces medioplexus Klein, 1905, p. 61.
Pneumonoeces medioplexus Seely, 1906, p. 252.
Pneumonoeces medioplexus Cort, 1905, p. 223, fig. 1D, 2, 4C, 11, 13.
Pneumonoeces medioplexus Irwin, 1929, p. 74, 76.

Resumimos em seguida as descripções de Stafford e Cort.

	STAFFORD	CORT
Comprimento	11 a 16 mm.	7,8 mm.
Largura	1,2 mm.	1,2 mm.
Cuticula	Com espinhos.	Com pequenos espinhos.
Acetabulo	Muito pequeno e difficil de observar, no terço anterior do corpo, mede 0,12.	Na proporção de 1:4 com a ventosa oral, mede 0,08 mm.
Ventosa oral	Com 0,31 mm.	Com 0,40 × 0,34 a 0,39 × 0,37 mm.
Pharynge	———	Com 3/4 da ventosa oral; 0,29 × 0,26 mm.
Testiculos	Redondos e obliquos.	Sem lobos.
Ovario	Redondo, post-acetabular.	Sem lobos.
Utero	Intra-cecal, sem alças longitudinaes.	Intra-cecal, sem alças longitudinaes.
Ovos	Com 0,028 × 0,018 mm. (Pratt 0,039 × 0,017).	0,022 a 0,032 × 0,013 a 0,018 mm.
Vitellinos	Com rosetas de 20 folliculos.	Rosetas de 18 a 23 folliculos grandes.
Habitat	*Rana virescens, Bufo lentiginosus*	*Rana pipiens.*

Distribuição geographica: America do Norte.

Ostiolum complexus (Seely, 1906).
(Est. LXXI, fig. 34).

Pneumonoeces complexus Seely, 1906, p. 249, figs. 1-2.

Pneumonoeces complexus Cort, 1915, p. 229, fig. 1C.

E' este o resumo da descripção de Seely:

Corpo allongado com 5 a 8 mm. de comprimento, por 1,7 a 2 mm. de largura; cuticula sem espinhos; acetabulo com 0,38 mm. de diametro (na proporção de 3:4 com a ventosa oral); ventosa oral com 0,40 mm.; testiculos post-equatoriaes sem lobos; ovario na zona acetabular em parte, alongado; canal de Laurer ausente; utero sem alças longitudinaes, intra cecal; ovos com 0,029 a 0,035 por 0,014 a 0,020 mm.; vitellinos desde logo abaixo do pharynge até o fim das zonas testiculares, cada roseta com 6-20 folliculos.

Habitat: pulmão (bocca) de *Rana pipiens.*

Distribuição geographica: America do Norte.

Ostiolum coloradensis (Cort, 1917).
(Est. LXXI, figs. 35—36).

Pneumonoeces coloradensis Cort, 1917, p. 231, fig. 1B, 4D, 5-8.
Pneumonoeces coloradensis Ward, 1918, p. 403, fig. 699.

Resumimos a descripção de Cort.

Corpo delgado e longo, com 3,3 a 8,1 mm. de comprimento por 0,5 a 1,5 mm. de largura. Cuticula com espinhos na extremidade anterior. Acetabulo na proporção de 4:5 da ventosa anterior; ventosa oral na proporção de 5:4 do acebulo e de 8:5 a 5:4 do pharynge; testiculos e ovario redondos, ou ovaes, ou irregulares, sem lobos; utero sem alças longitudinaes extra-cecaes; ovos com 0,032 a 0,039 por 0,018 a 0,021 mm.; vitellinos desde o meio da distancia entre o acetabulo e a extremidade anterior do corpo, até perto da extremidade posterior, lateraes, cecaes e extra-cecaes e com 8 a 14 folliculos em cada roseta.

Habitat: pulmão de *Rana pipiens.*

Distribuição geographica: America do Norte.

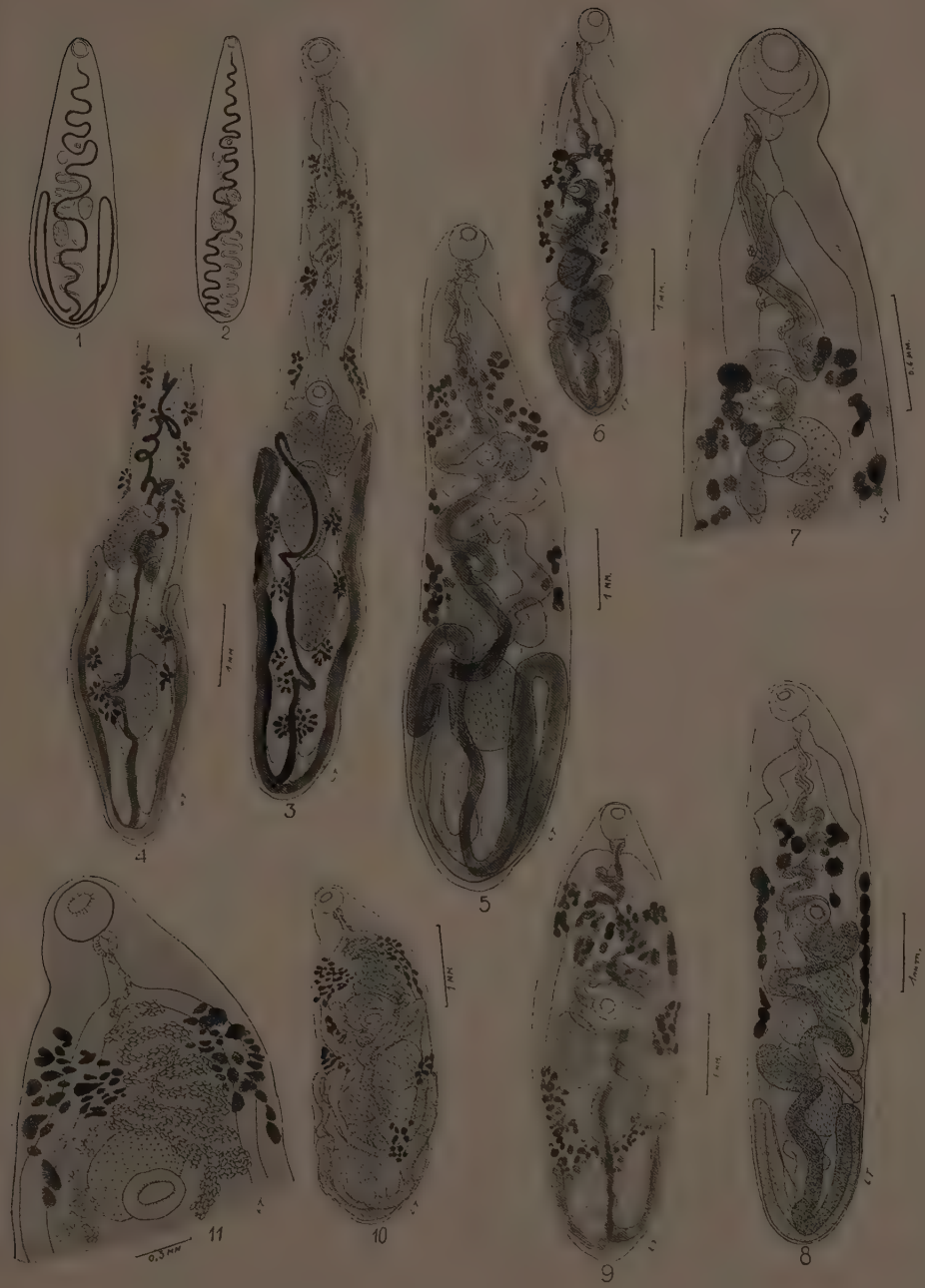
Explicação das figuras

ESTAMPA LXVI

Fig. 1—Eschema de *Pneumonoeces.*
Fig. 2—Eschema de *Ostiolum.*
Fig. 3—*Pneumonoeces variegatus*—original.
Fig. 4—*Pneumonoeces variegatus*—exemplar anomalo com duplicação do ovario e dos testiculos.
Fig. 5—*Pneumonoeces similis*—original; material do Turquestão.
Fig. 6—*Pneumonoeces similis*—original; material de Hamburgo.
Fig. 7—*Pneumonoeces similis*—extremidade anterior da fig. 6.
Fig. 8—*Pneumonoeces similis*—original; material de Hamburgo.
Fig. 9—*Pneumonoeces asper* — original; material do Turquestão.
Fig. 10—*Pneumonoeces asper* — original; material de Hamburgo.
Fig. 11—*Pneumonoeces asper*—extremidade anterior da fig. 10.

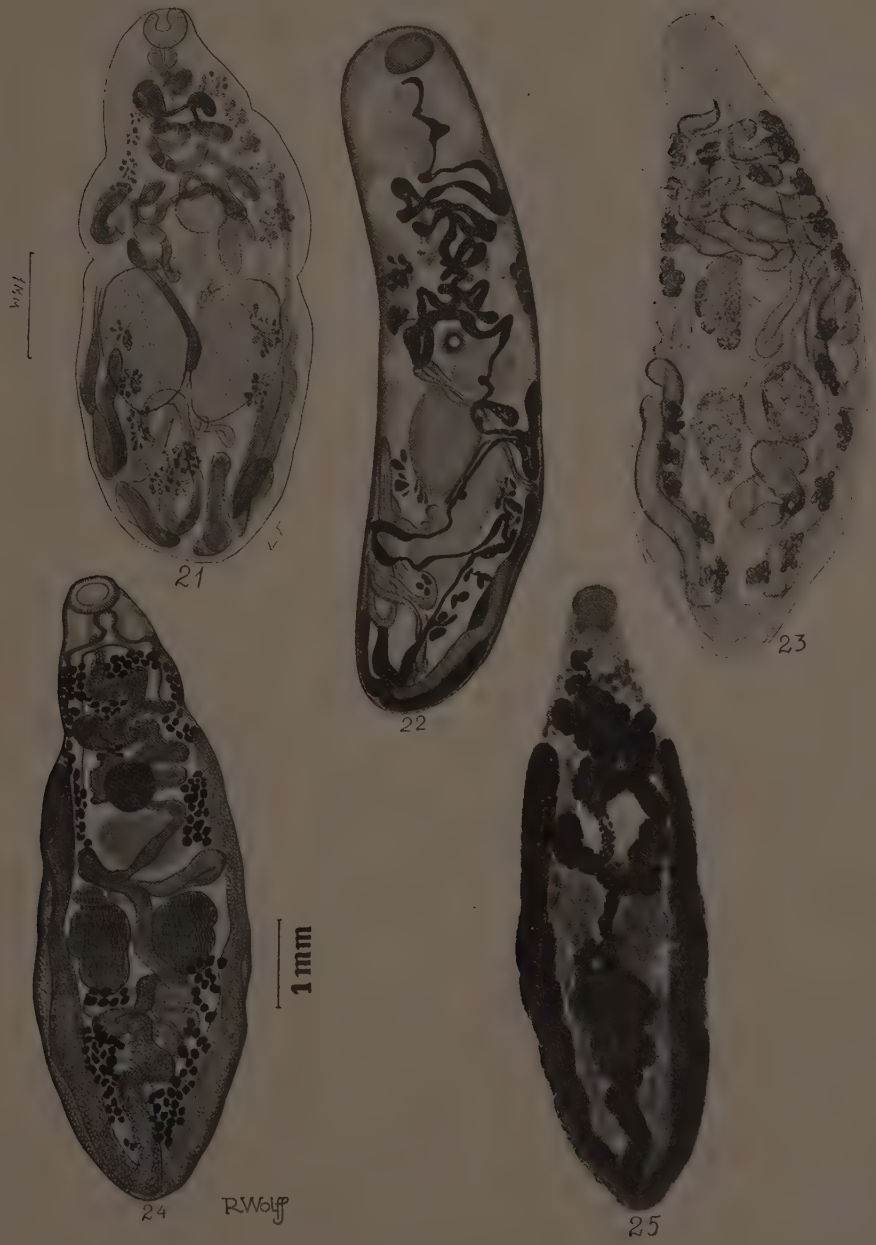
ESTAMPA LXVII

Fig. 12—*Pneumonoeces asper* — original; material de Hamburgo.
Fig. 13—*Pneumonoeces longiplexus* — segundo Stafford.

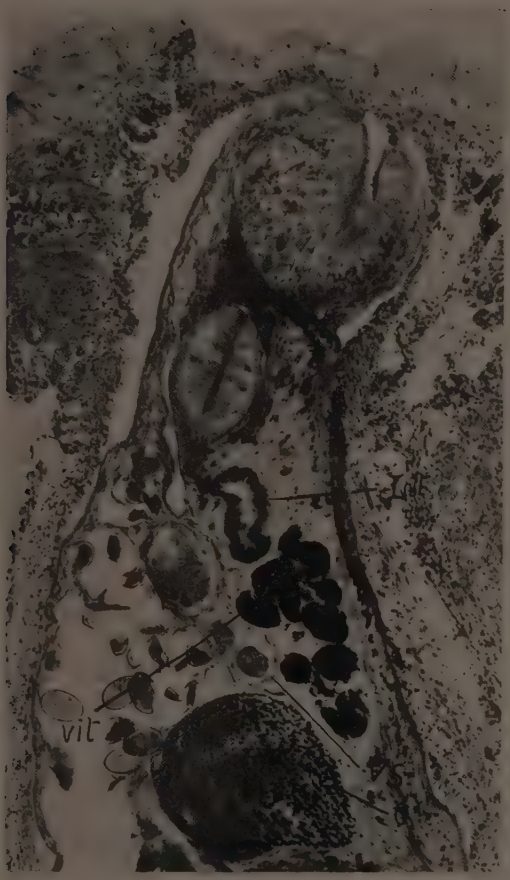


L. Travassos e A. R. Darriba : Trematodeos dos generos *Pneumonoeces* e *Ostiolum*.

L. Travassos e A. R. Darriba: Trematodeos dos generos *Pneumonoeces* e *Ostiolum*.



L. Travassos e A. R. Darriba : Trematodeos dos generos *Pneumonoeces* e *Ostiolum*.

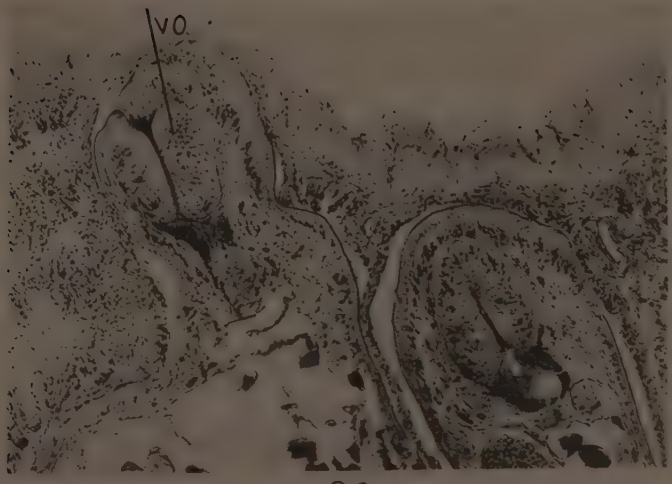


26

29

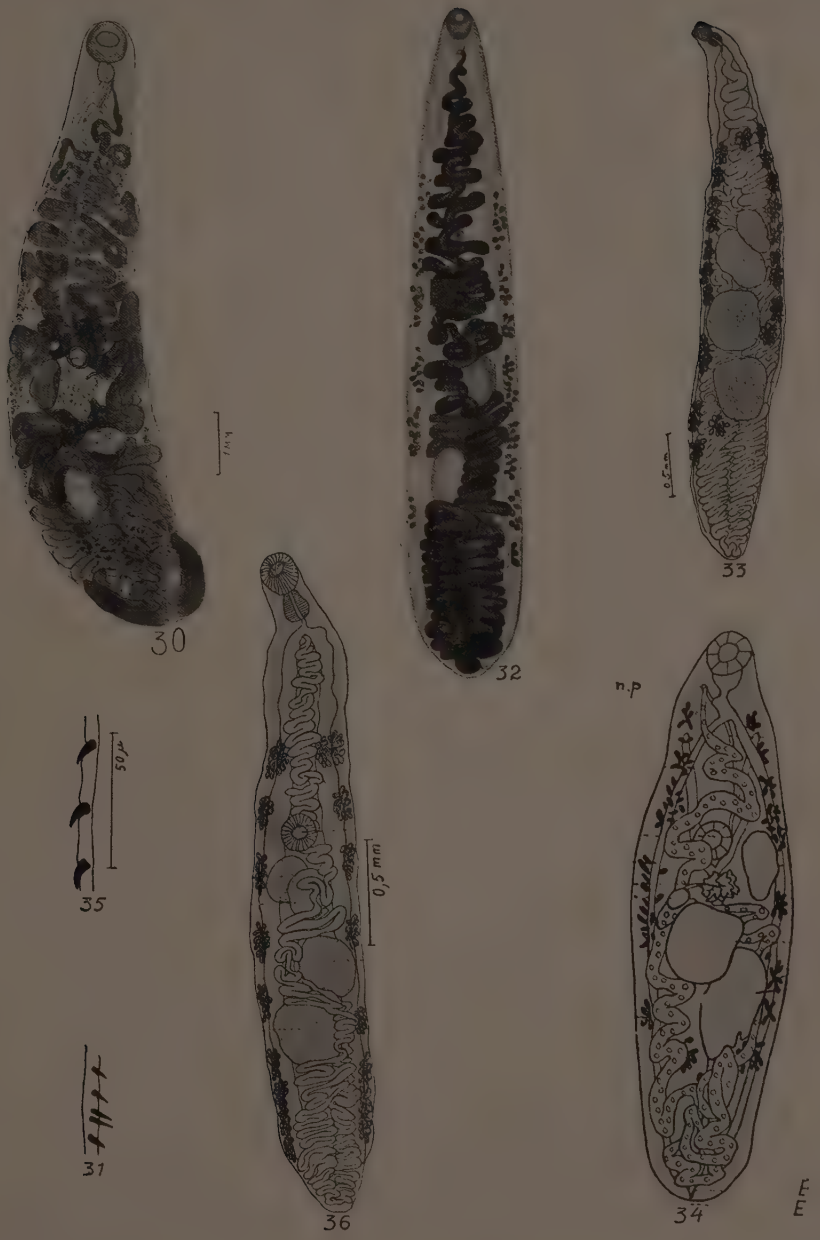
L. Travassos e A. R. Darriba : Trematodeos dos generos *Pneumonoeces* e *Ostiolum*.

27



28

L. Travassos e A. R. Darriba : Trematodeos dos generos *Pneumonoeces* e *Ostiolum*.



L. Travassos e A. R. Darriba : Trematodeos dos generos *Pneumonoeces* e *Ostiolum*.

Fig. 13a—*Pneumonoeces longiplexus*—espinhos cuticulares seg. Cort.
Fig. 14—*Pneumonoeces longiplexus* — segundo Cort.
Fig. 15—*Pneumonoeces breviplexus* — segundo Stafford.
Fig. 16—*Pneumonoeces breviplexus* — segundo Cort.
Fig. 17—*Pneumonoeces varioplexus* —segundo Stafford.
Fig. 18—*Pneumonoeces varioplexus (similiplexus)*—segundo Stafford.
Fig. 19—*Pneumonoeces varioplexus* — segundo Cort.
Fig. 20—*Pneumonoeces varioplexus* — espinhos cuticulares, segundo Cort.

ESTAMPA LXVIII

Fig. 21—*Pneumonoeces schulzei* — original.
Fig. 22—*Pneumonoeces campyristis* — segundo Klein, 1905.
Fig. 23—*Pneumonoeces australis* — segundo Johnston.
Fig. 24—*Pneumonoeces neivai* — segundo Travassos e Artigas.
Fig. 25—*Pneumonoeces neivai*—photographia; original.

ESTAMPA LXIX

Fig. 26—*Pneumonoeces neivai*—photographia do córte de pulmão de *L. ocellatus*, vendo-se um parasito. *Vit.* vitellinos; *v. s.* vesicula seminal; *o.* ovario; *int.* intestino.

ESTAMPA LXX

Fig. 27—*Pneumonoeces neivai*—Photographia de córte de pulmão de *L. ocellatus; v. o.* ventosa oral; *vit.* vitellinos; *v. s.* vesicula seminal; *int.* cecos repletos de hematias; *o.* ovario.
Fig. 28—*Pneumonoeces neivai*—photographia de córte de pulmão de *Leptodactylus ocellatus*, vendo-se dois parasitos, *v. o.* ventosa oral.
Fig. 29—*Pneumonoeces parviplexus* — segundo Seely.

ESTAMPA LXXI

Fig. 30—*Pneumonoeces fuelleborni*—original.
Fig. 31—*Ostiolum medioplexus*—espinhos cuticulares—segundo Cort.
Fig. 32—*Ostiolum medioplexus* — segundo Stafford.
Fig. 33—*Ostiolum medioplexus* — segundo Cort.
Fig. 34—*Ostiolum complexus*—segundo Irwin.
Fig. 35—*Ostiolum coloradensis*—espinhos cuticulares, segundo Cort.
Fig. 36—*Ostiolum coloradensis*—segundo Cort.

Sobre os mosquitos que se criam em buracos de arvores (*)

pelo

DR. A. da COSTA LIMA

(Com as estampas LXXII—LXXIII).

Os mosquitos, como os demais insectos, ao fazerem as posturas, preferem, via de regra, certos e determinados criadouros. Haja a vista o que occorre com os que se criam na agua accumulada na base das folhas de bromeliaceas, cujas larvas só excepcionalmente são vistas em outros criadouros. O mesmo se verifica com as que se criam em bambús ou taquaras e nos buracos de arvores. Tambem, em taes fócos, mui raramente se acha uma ou outra larva differente das que frequentemente nelles se criam. Assim é que o *Aëdes (Stegomyia) aegypti*, que, de preferencia, desova e se desenvolve em aguas relativamente limpas de quaesquer recipientes, dentro ou nas proximidades das habitações, póde, accidentalmente, fazer posturas nos typos especiaes de criadouros acima referidos, ou em outros, como buracos de caranguejos ou maiores collecções d'agua em depressões do sólo, nos quaes habitualmente se desenvolvem larvas de outras especies.

No presente artigo estudarei apenas alguns mosquitos que, em geral, se criam em buracos de arvores.

Das especies, cuja area de destribuição conhecida se estende até o Brasil, conhecem-se as seguintes cujas larvas têm sido encontradas em taes fócos.

Sabethes cyaneus (Fabricius, 1805); *Sabethes bipartipes* Dyar & Knab, 1906; *Sabelhoides chloropterus* (Humboldt, 1820), *Limatus durhamii* Theobald, 1901; *Wyeomyia (Dendromyia) luteoventralis* Theob., 1901 (=*bromeliarum* Dyar & Knab, 1906) [1]; *Haemagogus (Stegoconops) equinus* Theobald, 1903; *Haemagogus (Stegoconops) leucomelas* Lutz, 1904 e 1905; *Aëdes (Finlaya) terrens* (Walker, 1865); *Aëdes (Howardina) fulvithorax* (Lutz, 1904 e 1905); *Culex (Melanoconion) conservator* Dyar & Knab, 1906; *Culex (Melanoconion) orginator* Gordon & Evans, 1922; *Culex (Culex) corniger* Theobald, 1903; *Culex (Culex) mollis* Dyar & Knab, 1906; *Culex (Culex) declarator* Dyar & Knab, 1906; *Culex (Culex) spinosus* Lutz, 1904 e 1905; *Culex (Culex) coronator* Dyar & Knab, 1901 (accidentalmente), *Orthopodomyia fascipes* (Coquillet, 1905); *Anopheles (Anopheles) eiseni* Coquillett, 1902.

Passo em seguida a tratar das especies que tive o ensejo de estudar.

[1] Sobre esta especie farei alguma considerações em um artigo que será publicado depois deste.

(*) Recebido para publicação a 12 de Abril de 1930.

Aëdes (Finlaya) terrens (Walker, 1856)

(?=Haemagogus oswaldi Lutz, 1904 e 1905)

Até 1921, *Culex terrens* Walker e *Haemagogus oswaldi* Lutz, 1904 (ou *Gualteria oswaldi* Lutz, 1905) eram considerados especies distinctas.

Bonne—Wepster & Bonne (1921), examinando a terminalia do typo de *Culex terrens*, verificaram tratar-se de um *Aëdes* do grupo *oswaldi*. Nesse mesmo anno, porém, Dyar, revendo algumas das especies de *Aëdes* do subgenero *Finlaya*, incluio *oswaldi* na synonymia de *terrens*, dizendo o seguinte:

> «Dr. and Mrs. Bonne remark that the hypopygium of Walker's type of *terrens* differs from *oswaldi* by the presence in the latter of a long subapical seta on the claspette. This is figured in the monograph (1912) and described by me (1918), but proves to be an artifact, not shown in fresh mounts from the same locality».

Conheço a especie, não só pela descripção detalhada de Lutz (1905) como por 2 exemplares femeas, por elle determinados como *Gualteria oswaldoi* e apanhados na Venezuela.

O que se vê em taes specimens está perfeitamente de accôrdo com a minuciosa descripção de *Gualteria oswaldi*, feita por Lutz. Todavia, a ausencia de um exemplar macho, que me permittiria o exame da terminalia e da ornamentação de escamas prateadas do thorax, impede-me confirmar ou infirmar o julgamento feito por Dyar, dizendo si o mosquito que aqui se conhece pelo nome de *Gualria oswaldoi* é ou não identico a *Aëdes (Finlaya) terrens* (Walker).

Como na caracterisação das especies do subgenero *Finlaya* a côr das pernas têm sido considerada de uma certa importancia, dou aqui uma descripção do que noto nos 2 especimens de Lutz ha pouco referidos.

Femures anteriores e médios, vistos pela parte ventral, pretos, com uma mancha de escamas brancas, do meio até perto da extremidade proximal. Nos anteriores, em que essa mancha é menos extensa que nos médios, a porção negra apical é mais notavel que a mesma nos segundos. Vistos pela parte dorsal, são ambos negros. Os médios, entretanto, apresentam o extremo apical com algumas escamas brancas. Femures posteriores com a metade proximal branca, excepto uma mancha, quasi imperceptivel, quando vistos com fraco augmento, logo em seguida ao trochanter. A metade distal é preta, excepto no extremo apical, que apresenta um distincto annel branco, que se alarga para o bordo inferior.

Tarsos anteriores com uma pequena mancha clara na base e no apice do 1º articulo e na base do 2º.

Tarsos médios com o 1º articulo quasi todo branco; apenas no meio, occupando uma area correspondente a 1/6 da extensão do articulo, ha um annel escuro, e, no apice do mesmo, um outro annel, quasi imperceptivel, separando a area branca distal do 1º articulo da area branca proximal do 2º; esta occupa a metade basal do articulo.

Tarsos posteriores com o quarto apical do 1º articulo e o terço basal do segundo, brancos. Na articulação destes dois articulos ha algumas cerdas pardas e escamas mais escuras, que formam um annel escuro, quasi imperceptivel com augmento fraco. No extremo basal do 1º articulo ha algumas escamas mais claras.

Encontrei na collecção do Instituto duas preparações, com fragmentos de exuvias de larvas e pupas, acompanhadas de um rotulo, escripto por Lutz, com os seguintes dizeres: «*Gualteria oswaldoi*. Buraco de guayamú (caranguejo). Manguinhos, III, 12».

Farei algumas considerações sobre esta larva quando tratar da larva da es-

pecie seguinte. As referidas preparações acham-se actualmente, na collecção que estou organisando, com os numeros 1048 e 1049.

Aëdes (Finlaya) podographicus Dyar & Knab, 1906.

(?=Aëdes (Finlaya) thorntoni Dyar & Knab, 1907).

Em Janeiro do anno passado o Dr. Lauro Travassos, trouxe de Angra dos Reis (E. do Rio) duas larvas de um fóco encontrado n'um buraco de páo.

As pupas dessas larvas deram dois pequenos mosquitos, um macho e uma femea, muito semelhantes a especie ha pouco estudada. A principio julguei que fossem exemplares pouco desenvolvidos dessa especie. Todavia, depois de examinal-os mais detidmente, verifiqueai que della differiam, não sómente pelo tamanho bem menor (3,5 mm.), como pela ornamentação das escamas prateadas do thorax, do abdomen e pela disposição das manchas brancas das pernas. E a distincção entre a especie que tinha em mãos e a especie *terrens* (? = *oswaldi*) patenteou-se ainda mais quando examinei a terminalia do macho e os caracteres larvaes. Foi então que notei que taes especimens deviam ser identificados ou com *podographicus* Dyar & Knab ou com *thorntoni* Dyar & Knab.

Nos nossos exemplares, quer na femea, quer no macho, as duas manchas de escamas prateadas do mesonoto são inteiramente separadas adiante. Isso importa em não se os poder considerar como pertencentes a especie *thorntoni*, na qual, em ambos os sexos, taes manchas se reunem na parte anterior do mesonoto. Entretanto os caracteres da terminalia são identicos aos de *podographicus* e de *thorntoni*. Aliás, as differenças que Dyar assignala, relativas a tal estructura nestas duas especies, com o ser insignificantes, bem podem correr por conta da montagem do material examinado. Segundo elle, em *thorntoni* o filamento da «claspette» é tão longo quanto o dobro do comprimento da haste desse orgão, emquanto que em *podographicus* tem menos do dobro desse comprimento.

No material por mim examinado o filamento é exactamente como em *thorntoni* fino, recurvado e approximadamente com duas vezes o dobro do comprimento da haste que o supporta. Esta apresenta tambem 3 cerdas no lado interno. Os decimos esternitos apresentam-se tambem com apices espessados, nos quaes se inserem 3 cerdas um pouco recurvadas para fóra.

A disposição das manchas brancas nas pernas, como se póde vêr na descripção que se segue, está mais ou menos de accôrdo com o que se lê, tanto na descripção de *podographicus*, como na de *thorntoni*.

Femures anteriores e médios, vistos pela parte ventral, pretos, com uma mancha de escamas brancas, de igual extensão, na metade basal, porém um tanto afastada do extremo basal.

Os médios apresentam ainda um annel branco apical. Os femures posteriores apresentam, da base para o apice: uma parte negra basal, uma parte branca, cerca de quatro vezes mais extensa que a precedente, outra parte negra, um pouco mais extensa que a do extremo basal e finalmente um annel branco apical, tão extenso quanto a parte negra basal.

Tarsos anteriores com uma mancha branca na base e no apice do 1º articulo e outro na base do 2º articulo.

Tarsos médios com o 1º articulo branco, excepto no meio, onde ha um largo annel escuro, occupando cerca de um terço do comprimento do articulo. A area branca apical é um pouco mais extensa que a basal; 2º articulo com uma area branca basal, occupando menos da metade basal do articulo.

Tarsos posteriores: 1º articulo com um estreito annel branco basal e um annel branco apical (cerca de um sexto da extensão do articulo); 2º articulo com um estreito annel branco basal.

No que respeita aos caracteres larvaes: as larvas de *terrens, podographicus* e *thorntoni* são praticamente identicas. Comparando-as, segundo as descripções de Dyar, a unica differença notavel entre *terrens* e as duas outras especies reside nas cerdas da cabeça. Em *terrens* ellas são bifurcadas, sendo simples em *podographicus* e *thorntoni*. E' tambem esta a disposição que se observa nas larvas dos nossos especimens de Angra dos Reis, montados nas preparações 683 e 684. Nas preparações de *oswaldi*, referidas quando tratei de *terrens*, só resta uma cerda cephalica e esta é igualmente simples. A placa labial, porém, é um pouco differente da mesma peça nos exemplares de Angra.

Quanto as pupas: ha notaveis differenças entre as dos especimens de Angra, que considero identicos a *podographicus* e *thorntoni*, e os determinados por Lutz, como da especie *oswaldi*. As tubas respiratorias destas ultimas são relativamente mais curtas e os ultimos segmentos abdominaes não apresentam a ornamentação de cerdas, tão notavel n'aquellas, como se póde apreciar nas figuras abaixo.

Todo o nosso material referente a *podographicus* acha-se no vidro nº 292 e nas laminas 683, 684, 1030 e 1051 (collecção entomologica do Instituto).
Lutz, 1904.

Extremidade caudal da pupa de *A. thorntoni*.

Tubas respiratorias de *A. oswaldoi* (maior) e de *A. thorntoni* (menor).

Haemagogus (Stegoconops) leucomelas Lutz, 1904.

(?=Aëdes (Conopostegus) laeucocelaenus Dyar & Knab, 1924.

Em fevereiro deste anno o Snr. Paulo C. Sampaio trouxe-me algumas larvas desta especie, de um fóco encontrado na cavidade de uma arvore, á rua das Laranjeiras nº 289 (Rio).

Os mosquitos que obtive desse material apresentam os caracteres assignalados não só na descripção original de Lutz, como nas descripções e figuras da terminalia feitas por Dyar (1922 e 1928). Esta especie foi incluida por Howard, Dyar & Knab em 1917 no genero *Aëdes*. Mais tarde, porém, Dyar (1922) classificou-a como *Haemagogus (Stegoconops) leucomelas* Lutz. Tempos depois (1924) esse mesmo auctor passou a consideral-a novamente como um *Aëdes*, preferindo o nome especifico *leucocelaenus*, por se achar preoccupado com *leucomelas* Meigen. Finalmente em 1925 elle a fez typo de um novo subgenero *(Conopostegus)* do genero *Aëdes*.

As razões apresentadas por Dyar para separar *leucomelas* do genero *Haemagogus*, ao meu ver, não procedem.

Trata-se, de facto, como elle mesmo ponderou em seu trabalho de 1924, de uma fórma intermediaria entre *Haemagogus* e *Aëdes*.

Acho, porém, que ella muito mais se approxima de *Haemagogus* do subgenero *Stegoconops*, que de *Aëdes*.

A mudança do nome especifico *leucocelaenus* só se justificaria no caso de se manter a especie de Lutz no genero *Aëdes*. Isso porque já havia o *Culex leucomelas* Meigen 1804, incluido por Blanchard na lista dos culices incertos ou indeterminaveis, porém depois classificado por Martini (Ent. Mtteilungen, XI, 110, 1922) no genero *Aëdes*, ficando assim *Aëdes leucomelas* (Meigen) Martini.

Creio, todavia, estar com a razão propondo seja revalidada a designação da especie dada por Lutz e primitivamente adoptada por Dyar.

Não tendo sido, até agora, descriptas nem a larva, nem a pupa desta especie, apresento aqui photomicrographias de ambas e algumas notas relativas aos caracteres que não podem ser observados nas figuras.

Nas larvas, as cerdas do dorso da cabeça são simples, as da face inferior em tufos. Tufo ante-antennal com 4 ramos. Antennas quasi cylindricas, adelgaçando-se ligeiramente para a extremidade, com espinhos pequenissimos, esparsamente dispostos e, no lado interno e quasi no meio (um pouco mais para a base que para o apice), uma cerda fina, cuja ponta não excede o apice da antenna. Cuticula glabra. Pente lateral de 8º segmento abdominal com uma fileira de 8 escamas livres, cada escama espiniforme, simples.

O tufo posterior do syphão respiratorio com 3 ramos. Os demais caracteres podem ser apreciados nas photomicrographias.

Nas nymphas, além dos caracteres que podem ser vistos na figura, devo assignalar a presença de uma pequena cerda nos angulos postero-lateraes dos uromeros. A do penultimo é bem mais robusta que as anteriores e a do ultimo se apresenta com 2 ou 3 ramos.

As larvas desta especie têm sido encontradas não só em cavidades de arvores (Urich e Jennings), como em internodios de bambús (Lutz). Peryassú encontrou-as em uma lata, com larvas de *Limatus durhami* e de *Aëdes aegypti*.

Taes larvas, como nota Peryassú (1908), realmente muito se parecem com as larvas de *Aëdes aegypti*. Basta, porém, ver que apresentam estylos pre-oraes [2] bem desenvolvidos, para se reconhecer de

---

[2] Designação usada por Lutz para as cerdas clypeaes espessadas.

prompto que não são larvas de *Stegomyia*, nas quaes taes producções se apresentam como simples cerdas, nem espessadas, nem falciformes.

O nosso material de *leucomelas* acha-se conservado no vidro 461 e nas laminas 1025, 1026, 1031-1033 (coll. entomologica do Instituto).

Bibliographia

BONNE—WEPSTER, J. & BONNE, C. 1921—Notas on south american mosquitoes in the British Museum. Ins. Ins. Mens., 9: 1—26.

DYAR, H. G. 1921—The species of *Finlaya* allied to *terrens* Walker. Ins. Ins. Mens., 9: 151—153.

DYAR, H. G. 1922—Notes on tropical american mosquitoes. Ins. Ins. Mens., 10: 188—196.

DYAR, H. G. & SHANNON, R. C. 1924—The subfamilies, tribes, and genera of American Culicidae. Jour. Wash. Acad. Sci., 14: 472—486.

DYAR, H. G. 1925—The mosquitoes of Panama. Ins. Ins. Mens., 13: 101—195

DYAR, H. G. 1928—The mosquitoes of the Americas.

LUTZ, A. 1905—Novas especies de mosquitos do Brasil. Imprensa Medica, 25 de Fever., 65.

PERYASSU, A. G. 1908—Os culicideos do Brazil.

Explicação das estampas

ESTAMPA LXXII

Fig. 1—*Aëdes (Finlaya) terrens* (?=*oswaldi*), aza, × 27.

Fig. 2—*Aëdes (Finlaya) podographicus* (?=*thorntoni*), aza, × 32.

Fig. 3—*Aëdes (Finlaya) podographicus*, terminalia, × 90.

ESTAMPA LXXIII

Fig. 4—*Haemagogus (Stegoconops) leucomelas*, terminalia, × 90.

Fig. 5—*Haemagogus (Stegoconops) leucomelas*, exuvia larval, × 18.

Fig. 6—*Haemagogus (Stegoconops) leucomelas*, parte posterior da exuvia larval, vista na figura 5, × 68.

Fig. 7—*Haemagogus (Stegoconops) leucomelas*, pupa, × 18.

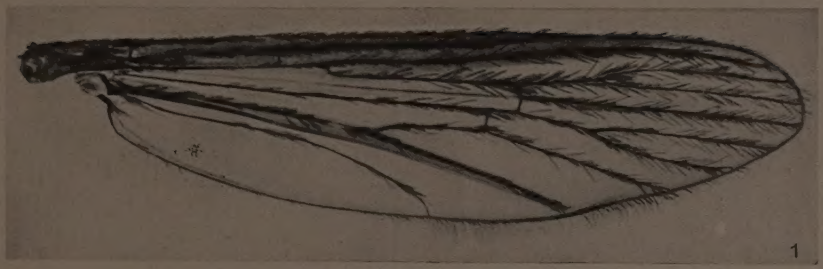
(Photomicrographias de J. Pinto)

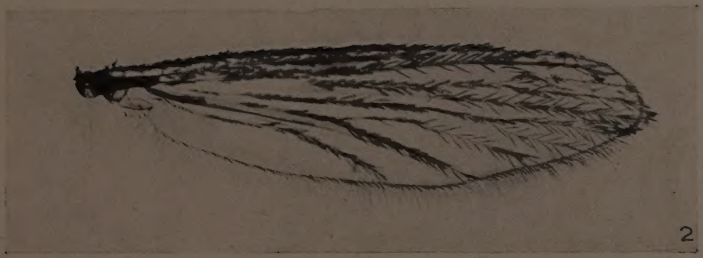
INDICE DO TOMO XXIII

Aëdes (Conopostegus) leucocelaenus, 259
Aëdes (Finlaya) podographicus, 257
terrens, 256
thorntoni, 257
Alexina na febre amarella, 109
Anastrepha consobrina, 160
Ankylostomose, Proteinas do plasma na, 41
Ankylostomosis, Plasma proteins in, 50
Aragão, H. de Beaurepaire, 99, 102
Ascocotyle, 61, 80
angrense, 67 86
angeloi, 75, 94
arnaldoi, 72, 92
ascolonga, 76, 95
coleostoma, 63, 83
diminuta, 71, 90
filippei, 65, 84
italica, 66, 86
longa, 68, 87
minuta, 66, 85
nana, 69, 88
pithecophagicola, 70, 89
Balantidium aragaoi, 192, 193,
coli, 194
Especies de, em macacos, 192
Phenomeno de endomixis em, 189
simile, 195
Cafeeiro, Praga do, 35
Chronographo simples, 59
Cogumelos, Coloração nos tecidos, 175
Cruz, J. da Costa, 109, 131
Culicidae, 105, 153, 179, 255
Cunha, Aristides Marques 189, 213
Cystignatus melanonotus, 16
podicipinus, 17
poecilochilus, 17
Darriba, Antonio R., 237
Diptera, 105, 153, 160, 179, 255
Encyrtidae, 159
Endomixis, Phenomeno de, em *Balantidium*, 189
Entomoglossus pustulatus, 5, 24
Febre Amarella, Diagnostico pela dosagem da alexina, 109
Novas experiencias, 99
Sangue na, 173
Fièvre Jaune, Nouvelles expériences, 103
Gastrodiscus secundus, 170
Haemagogus oswaldi, 256
Haemagogus (Stegoconops) leucomelas, 259
Haplometra, 164
cylindracea, 164
Helminthologia, Pesquizas de, 61, 163, 169, 237
Heterophyidae, 61, 80
Hexacladia smithii, 159
Hippocreppis fuelleborni, 169
Hookworm disease, Plasma proteins in, 50
Hymenoptera, 159
Laranjeira, Praga da, 35
Leptodactylus, Especies brasileiras do genero, 1
Brasilian species of the genus, 21
albilabris, 9, 28
brevipes, 9, 14, 28
bufonius, 9, 15, 29
caliginosus, 2, 22
curtus, 10, 29
diptyx, 10, 29
echinatus, 15
flavopictus, 10, 29
gigas, 10, 29
intermedius, 8, 27
longirostris, 10, 29
macroblepharus, 10, 29
mystaceus, 10, 15, 30, 32
mystacinus, 10, 30
nanus, 11, 30
natalensis, 7, 26

ocellatus, 11, 30
ochraceus, 8, 28
pallidirostris, 6, 25
pentadactylus, 12, 31
poecilochilus, 13, 32
ponicipinus, 4, 24
pygmaeus, 13, 32
troglodytes, 13, 32
typhonius, 14, 32
validus, 18
vastus, 14, 32
Lima, A. da Costa, 99, 102, 105, 159, 255
Luiz, A., 1, 21
Macacus rhesus, Balantidium do 193
Pesquizas relativas a febre amarella no, 99, 103, 173
Magalhães, Octavio de, 185
Maracujas, Insectos de, 159
Moscas de maracujás, 160
Mosquitos da região neotropica, 153, 179
Mosquitos de buracos de arvores, 255
Muniz, Julio, 189, 213
Ostiolum, 237
coloradensis, 252
complexus, 252
medioplexus, 251
Parascocotyle, 62, 81
Passiflora, Insectos de, 159
Phagicola, 65, 85
Pinto, Cesar, 153, 179
Plagiorchidae, 164
Platymantis, especies do genero, 6, 26
Pneumonoeces, 239
asper, 243
australis, 248
breviplexus, 245
campyristris, 248
fuelleborni, 250
longiplexus, 244
neivai, 249
parviplexus, 250
schulzei, 247
similis, 242
variegatus, 239
varioplexus, 246
Pseudococcus cryptus, 35
Psorophora lineata, 179
genu-maculata, 179
Taeniorhynchus, Revalidação do genero, 105
Teixeira, J. de Castro, 41, 50
Travassos, Lauro, 61, 80, 163, 169, 237
Trematoda, 61, 80, 164, 169, 237
Trypetidae, 160
Vellard, J., 273
Vianna, M. Miguelote, 173
Villela, Gilberto G., 41, 50
Vogelsang, Enrique, 169
Xavier, Antonio Augusto, 59
Yellow fever, Diagnostics by dosage of alexin, 131

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil





Dr. Costa Lima: Sobre os mosquitos que se criam em buracos de arvores.

110

Dr. Costa Lima : Sobre os mosquitos que se criam em buracos de arvores.